

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK JARAK PAGAR  
(*Jatropha curcas* L.) BERDASARKAN PENANDA  
MOLEKULER RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

**TESIS**

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh gelar Magister Sains  
Program Studi Biosains**



**Oleh:  
Novi Andari Yasminingsih  
NIM: S900208016**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2009**

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK JARAK PAGAR  
(*Jatropha curcas* L.) BERDASARKAN PENANDA  
MOLEKULER RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)  
TESIS**

**Oleh  
NOVI ANDARI YASMININGSIH  
S900208016**

Telah dipertahankan di dapan penguji  
Dinyatakan telah memenuhi syarat  
Pada tanggal ..... 2009

Telah disetujui oleh tim penguji

<b>Jabatan</b>	<b>Nama</b>	<b>Tanda Tangan</b>	<b>Tanggal</b>
<b>Ketua</b>	<b>Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D.</b> <b>NIP. 131 472 192</b>	.....	.....
<b>Sekretaris</b>	<b>Dr. Sugiyarto, M.Si.</b> <b>NIP. 132 007 622</b>	.....	.....
<b>Anggota Penguji</b>	<b>Prof. Drs. Sutarno, M.Sc., Ph.D</b> <b>NIP. 131 649 948</b>	.....	.....
	<b>Prof. Dr. Ir. Ahmad Yunus, M.S</b> <b>NIP. 131 569 204</b>	.....	.....

Mengetahui

Direktur Program Pascasarjana UNS

Ketua Program Studi Biosains

.....  
Prof. Drs. Suranto, MSc., Ph.D.  
NIP. 131 472 192

.....  
Dr. Sugiyarto, M.Si.  
NIP. 132 007 622

## MOTTO DAN PERSEMBAHAN

1. Aku hanyalah satu orang, tapi aku adalah seseorang. Aku tak dapat melakukan segalanya, tapi aku dapat melakukan sesuatu. Dan apa yang dapat kulakukan itu, akan kulakukan dengan kasih karunia Allah ( Dwight L.Moody).
2. Lebih baik menjadi orang yang penting tetapi lebih penting menjadi orang yang baik. Satu bukti lebih berarti daripada seribu janji (Best Regard)
3. "Aku tahu, bahwa Engkau sanggup melakukan segala sesuatu, dan tidak ada rencana-Mu yang gagal. (Ayub 42:2)
4. Sekalipun aku mempunyai karunia untuk bernubuat dan aku mengetahui segala rahasia dan memiliki seluruh pengetahuan; dan sekalipun aku memiliki iman yang sempurna untuk memindahkan gunung, tetapi jika aku tidak mempunyai kasih, aku sama sekali tidak berguna. (I Korintus 13:2)

### Kupersembahkan Karya ilmiah ini untuk:

Wanita perkasa yang selalu menopang saat aku lemah, **ibuku** tersayang

**Bapak** yang dengan kesederhanaannya mengilhami langkah-langkahku

Pribadi yang tidak pernah meninggalkan aku dalam keadaan apapun, dengan segala yang dimilikinya semuanya dicurahkan untukku, suamiku tercinta

**Hari Sriwidodo, S.Sos.**

Malaikat-malaikat kecil belahan jiwaku yang selalu memotifasi aku dengan kelucuan dan kenakalannya, **Asa Jasmine Harimurti, Adenada Kharishma Daiva Harimurti** dan **Affecia Eska**

**Nathania Harimurti**

**Papa "J"** yang tidak pernah jenuh mendengarkan keluhan-keluhanku dalam doa

Dan **semua orang** yang selalu berdoa untuk kebahagiaan dan kesuksesanku.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan kemudahan bagi penulis sehingga dapat terselesainya tesis dengan judul “Analisis Keragaman Genetik Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Berdasarkan Penanda Molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Pada kesempatan ini, penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

1. Direktur Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D., yang telah memberikan motivasi, fasilitas dan bimbingan selama Penulis mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta serta selaku ketua ujian tesis yang banyak memberikan masukan dan saran bagi kesempurnaan tesis.
2. Wali Kota Surakarta Ir. H. Joko Widodo, yang telah memberikan ijin bagi Penulis untuk melanjutkan pendidikan Magister di Universitas Sebelas Maret Surakarta.
3. Ketua Program Studi Biosains Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta Dr. Sugiyarto, M.Si., yang senantiasa memberikan dorongan moril dan bimbingan selama mengikuti perkuliahan di Program Studi Biosains Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta serta selaku penguji comprehensive dan sekretaris ujian tesis yang telah memberikan kritik, saran, masukan dan bimbingan dengan penuh keikhlasan demi kesempurnaan tesis.
4. Prof. Drs. Sutarno, M.Sc., Ph.D., selaku pembimbing I yang dengan penuh kesabaran dan kebijaksanaannya selalu menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, kritikan, motivasi dan energi positif hingga terselesaikannya tesis.
5. Prof. Dr. Ir. Ahmad Yunus, M.S., selaku pembimbing II dan ketua Penelitian Hibah Bersaing 2009 Tahun III yang telah memberi kesempatan, sarana dan prasarana bagi peneliti untuk ikut serta dalam proyek penelitian yang dipimpin beliau. Dan dengan

keikhlasan dan pengorbanan waktu yang tak terhitung telah memberikan support, bimbingan, inspirasi, kritik dan saran untuk kesempurnaan dan terselesaikannya penyusunan tesis.

6. Segenap staf dosen pengajar yang telah memberi materi perkuliahan yang dapat menunjang kelancaran penelitian.
7. Dr. Ir. Sobir, M.S., selaku kepala laboratorium PKBT IPB Bogor yang telah memberi ijin dan menyediakan fasilitas bagi penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium PKBT IPB Bogor.
8. Kepala Dinas Dikpora Surakarta Drs. Amsori, SH, M.Pd., yang telah memberikan ijin bagi Penulis untuk melanjutkan pendidikan Magister di Universitas Sebelas Maret Surakarta.
9. Kepala SMP Negeri 5 Surakarta Dra. Hj. Muryati yang memberikan ijin dan kelonggaran waktu bagi penulis untuk melanjutkan studi di Program Magister pada Program Studi Biosains Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta.
10. Orang tua, suami dan anak-anakku, doa dan dorongan semangatnya yang merupakan motivator terbesar bagi Penulis serta cinta tulus yang mereka berikan telah menginspirasi Penulis dalam penyusunan tesis.
11. Mbak Sullasih selaku pegawai di laboratorium PKBT IPB Bogor, dengan seluruh waktu, tenaga dan keahlian yang dimilikinya telah membantu penulis dalam memahami dan melaksanakan penelitian awal di laboratorium PKBT IPB Bogor.
12. Mas Rosyid dengan senyuman kesabaran yang selalu ditebarkan, serta seluruh staf administrasi Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memperlancar sarana administrasi Penulis selama di Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta.
13. Teman-teman seangkatan dan seperjuangan yang selalu "kul sinangkul ing bot karepotaning konco".

14. Mbak Einstivina yang telah memotivasi, men-support Penulis dan kerjasamanya dalam melakukan penelitian di PKBT Bogor.
15. Mas Tulus Junanto, teman seperjuangan sekaligus sahabat penulis yang selalu menguatkan, memotifasi dan memberi penghiburan melalui ayat-ayat penguatan dan penghiburan yang selalu dikirimkan lewat sms.
16. Teman-teman Guru SMP Negeri 5 Surakarta serta "anak-anakku" kelas 9E SMP Negeri 5 Surakarta Tahun Pelajaran 2008-2009 atas doa dan semangat yang selalu diberikan memberikan banyak energi positif buat Penulis, serta semua pihak yang tidak dapat Penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan baik moril maupun materiil yang sangat berarti bagi Penulis, sehingga secara tidak langsung memberikan andil yang sangat besar dalam penyelesaian studi S2 Penulis.

Penulis menyadari bahwa semua bantuan dan kebaikan yang telah diberikan pada Penulis, Penulis tidak dapat membalasnya, Penulis berdoa semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas dengan kelimpahan berkat dan kebaikan semuanya. Penulis hanya dapat mengucapkan terima kasih dan semoga semua yang diberikan kepada Penulis menjadi amal ibadah yang tak putus-putusnya. Amin.

Surakarta,        Juli 2009

Penulis

# DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL .....	i
PENGESAHAN PEMBIMBING .....	ii
PENGESAHAN TIM PENGUJI.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PUBLIKASI TESIS.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	x
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
DAFTAR SINGKATAN.....	xxi
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Penelitian.....	1
B. Rumusan Masalah .....	10
C. Tujuan Penelitian .....	10
D. Manfaat Penelitian .....	11
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	
A. Tinjauan Pustaka.....	12
1. Taksonomi Jarak Pagar .....	12
2. Morfologi Jarak Pagar .....	14
3. Persyaratan Lingkungan Tumbuh .....	17
4. Distribusi dan Potensi Pengembangan Jarak Pagar.....	19

	5. Plasma Nutfah dan Pemuliaan Jarak Pagar .....	22
	6. Marka Molekuler .....	24
	7. Penanda Molekuler RAPD.....	27
	B. Kerangka Konseptual.....	31
BAB III	METODE PENELITIAN	
	A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	34
	B. Bahan dan Alat Penelitian .....	34
	1. Bahan Penelitian.....	34
	2. Alat Penelitian.....	35
	C. Rancangan Penelitian .....	35
	D. Prosedur Pengambilan Data .....	36
	1. Isolasi DNA .....	36
	2. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA .....	37
	3. Purifikasi DNA.....	38
	4. Pemilihan <i>Primer</i> Untuk Analisis RAPD.....	39
	5. Analisis Polimorfisme DNA dengan RAPD .....	40
	6. Elektroforesis .....	40
	E. Analisa Data .....	41
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
	A. Hasil Ekstraksi DNA.....	45
	B. Hasil Purifikasi DNA.....	46
	C. Hasil Seleksi <i>Primer</i> .....	47
	D. Hasil Amplifikasi DNA.....	48
	1. Amplifikasi DNA menggunakan <i>primer</i> SBH-3.....	49
	2. Amplifikasi DNA menggunakan <i>primer</i> SBH-15.....	50
	3. Amplifikasi DNA menggunakan <i>primer</i> OPE-7.....	52
	4. Amplifikasi DNA menggunakan <i>primer</i> OPG-2.....	53
	E. Penyusunan Matriks Similaritas.....	62
	F. Penyusunan dendogram berdasarkan penanda molekuler RAPD.....	63
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
	5. Kesimpulan.....	74
	6. Saran .....	75



DAFTAR PUSTAKA.....	76
LAMPIRAN - LAMPIRAN.....	82

# DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Perbandingan empat <i>primer</i> RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi 22 aksesori jarak pagar.....	56
Tabel 2. Komponen Reaksi PCR untuk karakterisasi RAPD.....	58
Tabel 3. Jumlah dan prosentase lokus polimorfik aksesori jarak pagar.....	60
Tabel 4. Nilai kemiripan genetik terbesar dan terkecil dari aksesori beberapa jarak pagar.....	63
Tabel 5. Pembagian kelompok aksesori jarak pagar pada jarak kemiripan kurang dari 0.60 atau kemiripan kurang dari 60%.....	65

# DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data Biner 22 Akses Jarak Pagar Berdasarkan NTSYS-pc versi 2.02i.....	82
Lampiran 2. Matriks Similaritas 22 Akses Jarak Pagar Berdasarkan NTSYS-pc versi 2.02i.....	83
Lampiran 3. Nomor Akses dan Daerah Asal Akses Jarak Pagar Koleksi Asembagus.....	84
Lampiran 4. Cara Membuat Bahan-Bahan yang Diperlukan Dalam Penelitian .....	85
Lampiran 5. Foto Cara Kerja Analisis RAPD.....	88
Lampiran 6. Riwayat Hidup.....	91
Lampiran 7. Surat Keterangan Keikut sertaan Dalam Penelitian Hibah Bersaing 2009.....	92
Lampiran 8. Dendrogram berdasarkan kemiripan sifat morfologi antar akses jarak pagar asal Jawa.....	93
Lampiran 9. Gambar Kromosom Sel Somatik J. curcas, $2n = 2$ .....	94

## DAFTAR SINGKATAN

KIJB	:	Kebun Koleksi Jarak Pagar
PKBT	:	Pusat Kajian Buah Tropika
BBF	:	Bahan Bakar Fosil
BBM	:	Bahan Bakar Minyak
BBN	:	Bahan Bakar Nabati
CPO	:	Crude Palm Oil
FGE	:	Fuel Grade Ethanol
FAME	:	Fatty Acid Methyl Ester
CDM	:	Clean Development Mechanism
DNA	:	Dioxyribose Nucleic Acid
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
MAS	:	Marker Assisted Selection
QTL	:	Quantitative Trait Loci
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	:	Amplified Fragment Length Polymorphism
STS	:	Sequence Tagged Sites
SNPs	:	Single Nucleotide Polymorphism
ISSR	:	Inter Simple Sequence Repeat
SSR	:	Simple Sequence Repeat
BE	:	Baffer Ekstraksi
CTAB	:	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

EDTA	:	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
PVPP	:	Polivinilpolipirilidon
CIAA	:	Cloroform IsoAmilAlkohol
Buffer TE	:	Tris-HCl - EDTA
TAE	:	Tris-asetat EDTA
EtBR	:	Ethidium Bromide
NTSYS	:	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
SAHN	:	Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering
UPGMA	:	Unweight PairGroup Method Arithmetic
SIMQUAL	:	Similarity Qualitative
Pb	:	Pasangan basa
NTT	:	Nusa Tenggara Timur
NTB	:	Nusa Tenggara Barat

# DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Daun jarak pagar ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	15
Gambar 2. Bunga jarak pagar ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	15
Gambar 3. Buah dan Biji jarak pagar ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	16
Gambar 4. Skema Karangka Konseptual Penelitian.....	33
Gambar 5. Hasil Isolasi DNA.....	45
Gambar 6. Hasil Purifikasi DNA.....	47
Gambar 7. Hasil Optimasi <i>Primer</i> .....	48
Gambar 8. Hasil amplifikasi DNA lima belas aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> SBH-3. Ladder 1Kb. A1-A3 aksesori Jawa Timur, B1-B3 aksesori NTT, C3-C5 aksesori NTB, D1-D4 aksesori Sulawesi Selatan, T3-T4 aksesori Jawa Tengah. Ladder	50
Gambar 9. 1Kb..... Hasil amplifikasi DNA tujuh aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> SBH-3. Ladder 1Kb, J2-J3 aksesori Jawa Barat, S1 aksesori Palembang, S4 aksesori Sumatra	50
Gambar 10. Barat, Bk1-Bk3 aksesori Bengkulu ..... Hasil amplifikasi DNA lima belas aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> SBH-15. Ladder 1Kb. A1-A3 aksesori Jawa Timur, B1-B3 aksesori NTT, C3-C5 aksesori NTB, D1-D4 aksesori Sulawesi Selatan, T3-T4 aksesori Jawa Tengah.	51

Gambar 11.	Ladder 1Kb..... Hasil amplifikasi DNA tujuh aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> SBH-15. Ladder 1Kb, J2-J3 aksesori Jawa Barat, S1 aksesori Palembang, S4 aksesori Sumatra	51
Gambar 12.	Barat, Bk1-Bk3 aksesori Bengkulu, Ladder 1Kb..... Hasil amplifikasi DNA tiga belas aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> OPE-7. Ladder 1Kb. A1-A3 aksesori	52
Gambar 13.	Jawa Timur, B1-B3 aksesori NTT, C3-C5 aksesori NTB, D1-D4 aksesori Sulawesi Selatan..... Hasil amplifikasi DNA sembilan aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> OPE-7. T3-T4 aksesori Jawa Tengah, J2-J3 aksesori Jawa Barat, S1 aksesori Palembang, S4 aksesori	53
Gambar 14.	Sumatra Barat, Bk1-Bk3 aksesori Bengkulu, Ladder 1Kb..... Hasil amplifikasi DNA tiga belas aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> OPG-2. Ladder 1Kb. A1-A3 aksesori	54
Gambar 15.	Jawa Timur, B1-B3 aksesori NTT, C3-C5 aksesori NTB, D1-D4 aksesori Sulawesi Selatan..... Hasil amplifikasi DNA sembilan aksesori jarak pagar menggunakan <i>primer</i> OPG-2 T3-T4 aksesori Jawa Tengah,	54
Gambar 16	J2-J3 aksesori Jawa Barat, S1 aksesori Palembang, S4 aksesori Sumatra Barat, Ladder 1Kb, Bk1-Bk3 aksesori Bengkulu..... Dendogram 22 aksesori jarak pagar hasil analisis kluster	64

berdasarkan pola pita DNA dengan metode UPGMA

menggunakan 4 *primer*.....



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Penelitian**

Kehidupan manusia tidak akan pernah bisa lepas dari kebutuhan energi. Selama ini masyarakat Indonesia hanya menggantungkan kebutuhan energi BBM pada sumber minyak yang terbuat dari fosil. Padahal, cadangan bahan pembuat minyak ini semakin menipis dan akan segera habis dalam beberapa tahun mendatang karena sifatnya yang tak diperbarui (*unrenewable*).

Minyak bumi (mentah) terbentuk dari endapan fosil yang telah melalui proses dalam skala waktu geologis sehingga BBM dikategorikan sebagai energi fosil (*fossil fuel*). Walaupun merupakan bahan bakar yang tidak diperbarui (*unrenewable*), minyak bumi terus dikonsumsi kendati harganya meningkat. Persoalan peningkatan harga minyak mentah dunia yang relatif tinggi berakibat pada peningkatan harga BBM di Indonesia, yang secara langsung sangat dirasakan dampaknya oleh masyarakat.

Kontinuitas penggunaan bahan bakar fosil (*fossil fuel*) memunculkan paling sedikit dua ancaman serius: (1) faktor ekonomi, berupa jaminan ketersediaan bahan bakar fosil untuk beberapa dekade mendatang, masalah suplai, harga, dan fluktuasinya (2) polusi akibat emisi pembakaran bahan bakar fosil ke lingkungan. Polusi yang ditimbulkan oleh pembakaran bahan bakar fosil memiliki dampak langsung maupun tidak langsung kepada derajat kesehatan manusia.

Kebutuhan energi merupakan salah satu masalah penting yang dihadapi oleh bangsa Indonesia saat ini. Kebutuhan energi masyarakat dan industri setiap tahun mengalami peningkatan, sementara pasokan energi dalam negeri mengalami kendala akibat trend produksi energi yang lebih rendah dibanding tingkat konsumsinya. Tingginya ketergantungan

masyarakat terhadap minyak bumi memberikan konsekuensi tersendiri bukan saja beban yang memberatkan negara karena biaya subsidi yang harus diberikan untuk mempertahankan harga jual yang terjangkau oleh masyarakat, tetapi juga karena ketergantungan akan sumber energi ini sudah mendarah daging, sehingga ketika cadangannya habis, tak pelak lagi krisis energi menghantui masyarakat global tanpa terkecuali. Masalah tersebut tidak akan pernah dapat diselesaikan apabila kita masih bergantung kepada sumber energi fosil yang sifatnya tidak terbarukan (kalaupun ada memerlukan jutaan tahun untuk produksinya). Kondisi tersebut diperparah dengan pengolahan minyak bumi yang terpusat, sehingga masyarakat terpencil mengalami kesulitan untuk mendapatkan pasokan BBM. Harga BBM yang diterima oleh masyarakat tersebut akan lebih tinggi apabila dibandingkan dengan masyarakat perkotaan karena adanya selisih biaya transportasi. Perbedaan harga tersebut dapat mencapai 2-8 kali. Pengembangan sumber energi alternatif yang bersifat terbarukan merupakan solusi untuk mengatasi masalah tersebut.

Di tengah krisis bahan bakar saat ini, bermunculan berbagai pemikiran untuk mengembangkan sumber energi alternatif. Pengembangan energi alternatif yang dapat diperbarui merupakan jalan keluar yang menjanjikan, antara lain yang berbahan baku campuran minyak jarak atau CPO (*Crude Palm Oil*) dengan solar atau disebut *biofuel*. Penggunaan *biofuel* ini merupakan solusi dalam menghadapi kelangkaan energi minyak bumi, tidak saja dengan hal tersebut Indonesia dapat dengan mandiri menghasilkan sumber energinya, namun juga dapat menyejahterakan rakyatnya, sekaligus menanggulangi permasalahan lingkungan berupa lahan kritis dengan memanen energi dari tumbuhan penghasil energi.

Untuk mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar minyak pemerintah berperan aktif untuk menanggulangi masalah harga minyak yang makin meningkat dan cadangan yang makin menipis. Kebijakan pemerintah dalam pengembangan *biofuel* dengan membentuk tim nasional pengembangan bahan bakar nabati (BBN) sebagai upaya untuk mendukung pengembangan bahan bakar nabati dengan menerbitkan *blue print* dan *road map* untuk mewujudkan pengembangan BBN

tersebut.

Selain itu, pemerintah telah menerbitkan Peraturan Presiden Republik Indonesia nomor 5 tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif sebagai pengganti bahan bakar minyak. Kebijakan tersebut menekankan pada sumber daya yang dapat diperbaharui sebagai alternatif pengganti bahan bakar minyak. Untuk menyiapkan penyediaan *biofuel* ini, telah dikeluarkan Instruksi Presiden No. 1 Tahun 2006 yang menugaskan Menteri Pertanian untuk: (1) mendorong penyediaan tanaman bahan bakar nabati (*biofuel*), (2) melakukan penyuluhan pengembangan tanaman bahan baku bahan bakar nabati, (3) memfasilitasi penyediaan benih dan bibit tanaman bahan baku bahan bakar nabati dan (4) mengintegrasikan kegiatan pengembangan dan kegiatan pasca panen tanaman bahan baku bahan bakar nabati. Minyak jarak merupakan satu diantara berbagai macam sumber energi alternatif terbarukan yang prospektif untuk dikembangkan. Sebagai tindak lanjut, pada tanggal 1 Juli 2006, Presiden dan para pejabat negara telah melaksanakan *retret* di Desa Losari, Kecamatan Grabag, Magelang, dan memutuskan untuk mengembangkan bioenergi atau Bahan Bakar Nabati (BBN) sebagai energi alternatif pengganti Bahan Bakar Minyak mulai 2007 (Prihandana *et al.*, 2007).

*Biofuel* adalah setiap bahan bakar baik padatan, cairan ataupun gas yang dihasilkan dari bahan-bahan organik (Wikipedia, 2008). Menurut Surambo (2008). *Biofuel* berasal dari kata bio dan fuel, sehingga *biofuel* didefinisikan sebagai bahan bakar yang sumbernya berasal dari proses-proses biologi (terbarui). Bahan bakar ini dapat diambil dari tetumbuhan, hewan, ataupun sisa-sisa hasil pertanian. Saat ini, kita dapat menemukan *biofuel* dalam bentuk padatan, cair dan gas yang dihasilkan dari material organik baik langsung dari tanaman ataupun secara tidak langsung dari proses industrial, komersial, domestik atau sisa-sisa hasil pertanian. Secara umum terdapat tiga metode untuk mendapatkan *biofuel* yakni pembakaran sisa-sisa organik seperti buangan rumah tangga/industrial, sisa-sisa hasil pertanian, kayu, dan gambut; fermentasi anaerob semisal dalam proses/pembuatan biogas dari kotoran hewan; dan fermentasi aerob (terdapat dua tipe utama), yang

menghasilkan alkohol (bioetanol) dan ester (biodiesel).

Bioetanol adalah etanol yang diperoleh dari proses fermentasi bahan baku yang mengandung pati atau gula seperti tetes tebu dan singkong. BBN jenis ini dapat digunakan untuk menggantikan premium (*gasoline*). Etanol yang dapat digunakan sebagai BBN adalah alkohol murni yang bebas air (*anhydrous alcohol*) dan berkadar lebih dari 99,5%, atau disebut dengan *fuel grade ethanol* (FGE). Campuran premium dan FGE disebut gasohol. Di Indonesia, Pertamina memberi merek dagang Biopremium untuk produk tersebut (Prihandana *et al.*, 2007).

Biodiesel, lebih tepat disebut sebagai FAME (*fatty acid methyl ester*) merupakan BBN yang digunakan untuk menggerakkan mesin-mesin diesel sebagai pengganti solar. BBN ini berasal dari minyak nabati yang dikonversi melalui reaksi fisika dan kimia, sehingga sifat kimiawinya telah berubah dari sifat aslinya. Saat ini Pertamina telah mengeluarkan produk semacam ini dengan nama dagang biosolar yang merupakan pencampuran FAME dengan solar biasa (petrosolar) (Prihandana *et al.*, 2007).

Biodiesel dapat dibuat dari minyak nabati, lemak binatang, dan ganggang. Beberapa tanaman penghasil minyak nabati adalah rape seed, kedelai, kelapa sawit, kelapa dan lain sebagainya. Dari sekian banyak tanaman penghasil biodiesel, tanaman kelapa sawit, tanaman kelapa, tanaman kacang brazil, dan tanaman jarak adalah paling potensial dikarenakan tingginya produktivitasnya (Surambo, 2008)

Biodiesel dapat digunakan, baik secara murni maupun dicampur dengan petrodiesel tanpa menyebabkan perubahan pada mesin kendaraan. Penggunaan biodiesel sebagai sumber energi semakin menuntut untuk direalisasikan karena merupakan salah satu solusi dalam menghadapi kelangkaan energi fosil pada masa yang akan datang.

Bila dibandingkan dengan bahan bakar diesel/solar, biodiesel bersifat lebih ramah lingkungan, dapat diperbaharui (*renewable*), dapat terurai (*biodegradable*), memiliki sifat pelumasan terhadap piston mesin karena termasuk kelompok minyak tidak mengering (*non-drying oil*), mampu

mengeliminasi efek rumah kaca, dan kontinuitas ketersediaan bahan baku terjamin. Biodiesel bersifat ramah lingkungan karena menghasilkan emisi gas buang yang jauh lebih baik dibandingkan diesel/solar, yaitu bebas sulfur, bilangan asap (*smoke number*) rendah, dan angka setana (*cetane number*) berkisar antara 57-62 sehingga efisiensi pembakarannya lebih baik, terbakar sempurna (*clean burning*), dan tidak menghasilkan racun (*nontoxic*) (Hambali, 2007).

Bahan Bakar Nabati, dalam bentuk bioetanol dan biodiesel ini seolah menjadi secercah harapan baru bagi dunia untuk menggantikan BBM yang dipastikan akan habis. Bioetanol dan biodiesel telah dibuktikan mampu menggantikan bensin dan solar sebagai nyawa utama transportasi dunia yang mengkonsumsi energi paling besar.

Pengolahan minyak yang berasal dari tumbuh-tumbuhan sebagai bahan bakar mesin telah lama digunakan. Hambatan dan beban utama yang dihadapi dari penggunaan minyak dari biji tumbuh-tumbuhan ini adalah mahalanya harga biodiesel. Hal ini terjadi karena minyak-minyak lemak yang mudah tersedia saat ini adalah minyak-minyak dan lemak pangan (*edible*), seperti minyak sawit, kelapa, kacang, jagung, dan lainnya yang nilai produknya lebih mahal dibandingkan biodiesel karena kebutuhannya bersaing dengan penggunaannya sebagai bahan pangan (Syah, 2006).

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) saat ini menjadi tanaman yang sangat populer karena merupakan salah satu bahan baku alternatif untuk menghasilkan bahan bakar nabati (*bio fuel*). Meningkatnya harga minyak bumi (*fossil fuel*) secara drastis serta menipisnya cadangan minyak di perut bumi membuat banyak kalangan berusaha mencari alternatif energi terbarukan yang dapat digunakan sebagai substitusi minyak bumi. Belum lagi kerusakan lingkungan yang diakibatkan *fossil fuel* yang menghasilkan emisi gas rumah kaca, membuat para pemerhati lingkungan menggencarkan kampanye penggunaan bahan bakar nabati. Jarak pagar sebagai *biofuel* berpeluang besar untuk dikembangkan sebagai proyek *clean development mechanism* (CDM) (Maman, 2006).

Pemanfaatan minyak *J.curcas* L. sebagai bahan biodiesel merupakan alternatif yang ideal untuk mengurangi tekanan permintaan bahan bakar minyak dan penghematan penggunaan cadangan

devisa. Minyak jarak pagar selain merupakan sumber minyak terbarukan (*renewable fuels*) juga termasuk *non edible oil* sehingga tidak bersaing dengan kebutuhan konsumsi manusia seperti pada minyak kelapa sawit, kelapa, ketela pohon dan minyak jagung (Dwimahyani, 2005). Dengan demikian, pemanfaatan minyak jarak pagar sebagai bahan baku biodiesel tidak akan mengganggu stok minyak makan nasional, kebutuhan industri oleokimia, dan ekspor CPO (Hambali, 2007).

Luas lahan kritis di Indonesia lebih dari 20 juta ha, sebagian besar berada di luar kawasan hutan, dengan pemanfaatan yang belum optimal atau bahkan cenderung ditelantarkan. Dengan memperhatikan potensi tanaman jarak yang mudah tumbuh, dapat dikembangkan sebagai sumber bahan penghasil minyak bakar alternatif pada lahan kritis dapat memberikan harapan baru pengembangan agribisnis. Keuntungan yang diperoleh pada budidaya tanaman jarak di lahan kritis antara lain (1) menunjang usaha konservasi lahan, (2) memberikan kesempatan kerja sehingga berimplikasi meningkatkan penghasilan kepada petani dan (3) memberikan solusi pengadaan minyak bakar (biofuel). Permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan minyak jarak adalah keterbatasan informasi tentang varietas unggul yang memiliki sifat-sifat menguntungkan seperti rendemen minyak yang tinggi dalam bijinya, produksi yang tinggi, serta ketahanan terhadap hama dan penyakit. Dalam hal ini pemuliaan tanaman memiliki peran yang sangat penting.

Diskripsi tanaman jarak pagar di Indonesia masih dilakukan sederhana dan tidak bersifat universal, sehingga dalam penyebutan jenis tanaman jarak pagar masih berdasarkan penampilan fenotipe tanaman tersebut atau berdasarkan daerah asal tanaman jarak pagar tersebut. Penggunaan ciri morfologi atau fenotipe memiliki keterbatasan karena sangat dipengaruhi lingkungan sehingga akan memberikan hasil yang berbeda-beda.

Pengelompokan secara fenetik merupakan suatu cara klasifikasi berdasarkan kesamaan karakter morfologi, sedangkan klasifikasi filogenetik merupakan cara klasifikasi gabungan sifat genotip dan lingkungan. Pengelompokan berdasarkan penanda molekuler menggunakan penanda molekuler (genotip ).

Untuk itulah perlu dikembangkan suatu informasi genetik yang bersifat universal. Upaya ini dapat diwujudkan menggunakan penanda molekuler. Informasi berdasarkan analisis molekuler diharapkan mampu menjawab permasalahan dalam karakterisasi tanaman jarak pagar yang ada di Indonesia. Penanda molekuler antara lain penanda isozim dan penanda DNA. Kedua penanda tersebut mempunyai prinsip dan interpretasi genetika yang sama. Perbedaan terlihat pada pita polimorfisme. Pada isozim berupa protein atau ekspresi gen, sedangkan pada marka DNA berupa fragmen DNA. Penggunaan penanda isozim, meskipun murah, namun memiliki kelemahan. Karena merupakan hasil ekspresi gen, yaitu protein, maka ekspresi isozim pada tanaman dipengaruhi lingkungan maupun bagian tumbuhan yang digunakan dalam analisis. Penelitian dengan penanda DNA lebih akurat karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Permasalahan dalam persilangan tanaman jarak pagar adalah penentuan tetua yang dapat digunakan dalam persilangan antar kultivar yang bertujuan untuk menghasilkan varietas unggul baru. Sampai saat ini belum ada varietas baru yang merupakan hasil persilangan di antara kultivar-kultivar yang ada. Permasalahan penentuan tetua yang dapat digunakan dalam persilangan antar kultivar dapat diatasi dengan melakukan seleksi terhadap kultivar tanaman jarak pagar yang menunjukkan perbedaan penanda molekuler yang berhubungan dengan sifat morfologi terbaik yang akan digabungkan.

Permasalahan lain dalam pemuliaan tanaman jarak pagar adalah kegiatan pemuliaan diarahkan untuk memperbaiki kualitas dan kuantitas biji jarak pagar, yang pada gilirannya akan diperoleh biji jarak pagar dengan kandungan minyak yang baik. Permasalahan untuk menyaring sifat unggul dapat diatasi dengan mengetahui penanda molekuler-RAPD.

Salah satu penanda DNA yang dapat diterapkan adalah metode *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Penanda RAPD mampu mendeteksi keragaman dan mengelompokkan keragaman berdasarkan pola pita DNA yang dapat menunjukkan ada atau tidaknya segmen kromosom pembawa gen atau alel yang diinginkan (Tanskley, 1991). Penanda RAPD tidak

dipengaruhi oleh lingkungan tumbuh dan fase perkembangan tanaman. Berdasarkan sifat penanda RAPD sebagai penanda dominan yang dapat dideteksi pada keturunan pertama (F1) maka RAPD dapat digunakan untuk membantu mempercepat seleksi sifat unggul pada tanaman jarak pagar.

## **B. Rumusan Masalah**

Informasi genetik jarak pagar penting artinya dalam pemuliaan tanaman. Penelitian ini akan mempelajari keragaman pada tanaman jarak pagar berdasarkan analisis RAPD dan bagaimana pengelompokannya berdasarkan kemiripan pola pita yang tampak pada analisis RAPD sebagai kontribusi informasi dalam proses pemuliaan tanaman. Berdasarkan hal tersebut permasalahan yang ditemukan adalah :

1. Bagaimana pola pita jarak pagar (*J. curcas*) aksesori Jawa Timur, NTT, NTB, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, Jawa Barat, Palembang, Sumatra Barat dan Bengkulu berdasarkan analisis RAPD ?
2. Bagaimana kemiripan genetik jarak pagar (*J. curcas*) aksesori Jawa Timur, NTT, NTB, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, Jawa Barat, Palembang, Sumatra Barat dan Bengkulu berdasarkan pola pita yang tampak pada analisis RAPD ?

## **7. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pola pita jarak pagar (*J. curcas*) aksesori Jawa Timur, NTT, NTB, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, Jawa Barat, Palembang, Sumatra Barat dan Bengkulu berdasarkan analisis RAPD.
2. Mengetahui keragaman karakterisasi sifat molekuler tanaman jarak pagar (*J. curcas*) aksesori Jawa Timur, NTT, NTB, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, Jawa Barat, Palembang, Sumatra



Barat dan Bengkulu menggunakan analisis RAPD dan mengelompokkannya berdasarkan pola pita yang tampak dari analisis RAPD.

## **8. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data molekuler jarak pagar yang bermanfaat bagi pengembangan sumber plasma nutfah yang ada di Indonesia khususnya tanaman jarak pagar sehingga dapat digunakan sebagai acuan bagi program pemuliaan tanaman di samping data morfologi dan sitologi yang tersedia. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan klon-klon tanaman jarak pagar unggulan dalam upaya penyediaan bahan baku BBN yang berkualitas untuk mengatasi krisis energi secara global pada umumnya, maupun di Indonesia khususnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA DAN KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

#### A. Tinjauan Pustaka

##### 1. Taksonomi JarakPagar

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) telah lama dikenal masyarakat Indonesia sebagai tanaman obat dan penghasil minyak lampu, bahkan sewaktu jaman penjajahan Jepang, yaitu sejak diperkenalkan oleh bangsa Jepang pada tahun 1942-an, saat itu masyarakat diperintahkan untuk melakukan penanaman jarak sebagai pagar pekarangan, konon minyaknya diolah untuk bahan bakar pesawat terbang. Tanaman Jarak berasal dari daerah tropis di Amerika Tengah khususnya Meksiko dan saat ini telah menyebar sampai ke Afrika dan Asia (termasuk Indonesia). Di Indonesia tidak ada catatan yang pasti kapan jarak pagar masuk ke wilayah Nusantara, tetapi diperkirakan bersamaan dengan di Malaysia. Jarak pagar merupakan tanaman serba guna, tahan kering dan tumbuh dengan cepat, dapat digunakan untuk kayu bakar, mereklamasi lahan-lahan tererosi atau sesuai dengan namanya, tanaman ini memang dimanfaatkan masyarakat sebagai pagar hidup di pekarangan dan kebun karena tidak disukai ternak. Manfaat lain dari minyak jarak selain sebagai bahan bakar juga dapat digunakan sebagai bahan untuk pembuatan sabun dan industri kosmetika. (Rini, 2008).

Di Indonesia terdapat berbagai jenis tanaman jarak antara lain jarak kepyar (*Ricinus communis*), jarak bali (*Jatropha podagrica*), jarak ulung (*Jatropha gossypifolia* L.) dan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). Diantara jenis tanaman jarak tersebut yang memiliki potensi sebagai penghasil minyak bakar (*biofuel*) adalah jarak pagar (*J. curcas* L. ) dalam bahasa Inggris disebut "Physic Nut".

Beberapa nama daerah (nama lokal) yang diberikan kepada tanaman jarak pagar ini antara

lain Sunda (jarak kosta, jarak budeg), Jawa Qarak gundul, jarak pager), Madura (kalekhe paghar), Bali (jarak pager), Nusa Tenggara (lulu mau, paku kase, jarak pageh), Alor (kuman nema), Sulawesi (jarak kosta, jarak wolanda, bindalo, bintalo, tondo utomene), Maluku (ai huwa kamala, balacai, kadoto) (Irwanto, 2006). Tanaman jarak pagar mempunyai nama ilmiah *Jatropha curcas* (Linnaeus). Dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan, kedudukan tanaman jarak pagar diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisio : Spermatophyta  
Sub Divisio : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Subkelas : Monochlamydeae (Apetalae)  
Ordo : Euphorbiales  
Famili : Euphorbiaceae  
Genus : *Jatropha*  
Species : *Jatropha curcas* L.

(Tjitrosoepomo, 2002).

### 3. Morfologi Jarak Pagar

Secara fisik *J. curcas* tidak memiliki fungsi lebih selain sebagai tanaman pagar. Buahnya tidak bisa dikonsumsi karena bisa menyebabkan keracunan karena menghasilkan racun "krusin". Padahal jika dicermati, tanaman yang mudah tumbuh di berbagai tempat ini memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia. Semua bagian tanaman ini berguna. Daunnya bisa untuk makanan ulat sutra, antiseptik, dan anti radang, sedangkan getahnya bisa untuk penyembuh luka dan pengobatan lain (Jauhari, 2005). Bagian tanaman jarak yang dapat dimanfaatkan adalah biji, akar, daun dan

minyak dari bijinya. Bagian daun digunakan sebagai obat untuk penyakit koreng, eczema, gatal (pruritus), batuk sesak dan hernia. Bagian akar digunakan untuk rematik sendi, tetanus, epilepsy, bronchitis pada anak-anak, luka terpukul, TBC kelenjar dan *schizophrenia* (gangguan jiwa). Bagian biji digunakan untuk mengurangi kesulitan buang air besar (konstipasi), kanker mulut rahim dan kulit (*carcinoma of cervix and skin*), *visceroptosis/gastroptosis*, kesulitan melahirkan dan retensi plasenta/ari-ari, kelumpuhan otot muka, TBC kelenjar, bisul, koreng, *scabies*, infeksi jamur dan bengkak (Departemen Teknologi Pertanian, 2005).

Tanaman jarak pagar berupa perdu dengan tinggi 1 - 7 m, bercabang tidak teratur. Batangnya berkayu, silindris, dan bila terluka mengeluarkan getah. Bagian - bagian jarak pagar:

### 1). Daun



Gambar 1. Daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.)  
Sumber: Irwanto (2006)

Daun tanaman jarak pagar adalah daun tunggal berlekuk dan bersudut 3 atau 5, daun tersebar di sepanjang batang. Daunnya lebar dan berbentuk jantung atau bulat telur melebar dengan

panjang 5 - 15 cm. Helai daun bertoreh berlekuk dan ujungnya meruncing. Tulang daun menjari dengan jumlah 5 - 7 tulang daun utama, warna daun hijau (permukaan bagian bawah lebih pucat dibanding bagian atas). Antara daun dan batang dihubungkan oleh tangkai daun dengan panjang 4 -15 cm.

## 2). Bunga



Gambar 2. Bunga jarak pagar (*Jatropha curcas* L.)  
Sumber: Hambali (2006)

Bunga tanaman jarak pagar adalah bunga majemuk berbentuk malai, berwarna kuning kehijauan, berkelamin tunggal, dan berumah satu (putik dan benang sari dalam satu tanaman) bunga betina 4-5 kali lebih banyak dari bunga jantan. Bunga jantan dan betina tersusun dalam rangkaian berbentuk cawan yang tumbuh di ujung batang atau ketiak daun. Bunga memiliki 5 kelopak berbentuk bulat telur dengan panjang kurang lebih 4 mm. Benang sari mengumpul pada pangkal dan berwarna kuning. Tangkai putik pendek berwarna hijau dan kepala putik melengkung keluar berwarna kuning. Bunganya mempunyai 5 mahkota berwarna keunguan. Setiap tandan terdapat lebih dari 15 bunga. Tanaman jarak pagar termasuk tanaman *monoecious* dan bunganya uniseksual. Kadangkala muncul hermaprodit yang berbentuk cawan berwarna hijau kekuningan.



a.

b.

Gambar 3. a. Buah jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) b. Biji jarak pagar (*Jatropha curcas*). Buah Jarak terbagi menjadi 3 ruang

Sumber : Info Tek Jarak Pagar 3 (8) 2008

Buah jarak pagar berupa buah kotak berbentuk bulat telur dengan diameter 2 – 4 cm. Panjang buah 2 cm dengan ketebalan sekitar 1 cm. Buah berwarna hijau ketika muda serta abu-abu kecoklatan atau kehitaman ketika masak. Buah jarak terbagi menjadi 3 - 5 ruang, masing-masing berisi satu biji sehingga tiap buah terdapat 3 - 5 biji. Biji berbentuk bulat lonjong dan berwarna coklat kehitaman. Biji inilah yang banyak mengandung minyak dengan rendemen mencapai 30% - 50% dan mengandung toksin sehingga tidak dapat dimakan.

Biji, daging buah, dan cangkang tanaman jarak pagar bisa digunakan sebagai bahan bakar. Selain itu bagian-bagian tubuh jarak juga bisa digunakan untuk insektisida, pupuk, dan biogas.

### 3. Persyaratan Lingkungan Tumbuh

Tanaman jarak pagar tumbuh sebagai tanaman liar atau tanaman pagar yang gampang hidup dan tidak rakus hara karena selain tahan kekeringan juga dapat tumbuh di tempat bercurah hujan 200 milimeter per tahun hingga 1.500 milimeter per tahun. Dengan sifat demikian, jarak pagar mudah ditanam di mana pun asal ada lahan. Jarak pagar hampir tidak memiliki hama karena sebagian besar bagian tubuhnya beracun. Umur tanaman ini bisa mencapai 50 tahun. Tanaman ini mulai berbuah setelah berusia lima bulan dan mencapai produktivitas penuh pada usia lima tahun (Syah, 2006), menurut Wanita, *et al.* (2006) jarak pagar mulai menghasilkan buah setelah berumur 4 bulan jika tanaman berasal dari setek, dan jika tanaman berasal dari biji. Kumar (2005) dalam Wijaya (2006)

menyatakan bahwa tanaman jarak memiliki kelebihan lain yaitu dapat tumbuh dan berproduksi secara realistis pada lahan-lahan marginal dan dapat survive pada periode kekeringan yang cukup panjang. Sedangkan Mahmud (2008) menyatakan bahwa jarak pagar dapat tumbuh pada lahan-lahan yang miskin hara dengan drainase dan aerasi yang baik. Pertumbuhannya cukup baik pada tanah-tanah ringan (terbaik mengandung pasir 60-90%), berbatu, berlereng pada perbukitan atau sepanjang saluran air dan batas-batas kebun. Lahan-lahan yang subur di mana air tidak tergenang juga dapat digunakan bagi pertanaman jarak pagar.

Tanaman jarak pagar mempunyai sistem perakaran yang mampu menahan air dan tanah sehingga tahan terhadap kekeringan serta berfungsi menahan erosi. Jarak pagar dapat tumbuh pada berbagai ragam tekstur dan jenis tanah. Bila perakarannya sudah cukup berkembang, jarak pagar dapat toleran terhadap kondisi tanah-tanah masam atau alkalin (terbaik pada pH tanah 5,5 - 6,5). *J. curcas*. tumbuh baik di lahan kering dataran rendah beriklim kering (LKDRK.) dengan ketinggian 0 - 500 m dpl dan curah hujan 300 - 1.000 mm per tahun. Tetapi jarak pagar tumbuh baik pada kisaran curah hujan 900 -1200 mm/tahun, tinggi tempat 0 - 400 m dpl. dengan bulan kering (curah hujan < 100 mm/bulan) 4 - 5 bulan (Allorerung *et al.*, 2006 dalam Erythrina, 2006). Sedangkan suhu berkisar antara 18° - 30° C. Pada daerah dengan suhu rendah (< 18° C) menghambat pertumbuhan, sedangkan pada suhu tinggi (> 35° C) menyebabkan gugur daun dan bunga, buah kering, sehingga produksi menurun (Mahmud, 2008). Menurut Hambali (2006) kisaran suhu yang sesuai untuk bertanam jarak pagar adalah 20 - 26° C. Pada daerah dengan suhu terlalu tinggi (di atas 35° C) atau terlalu rendah (di bawah 15° C) akan menghambat pertumbuhan serta mengurangi kadar minyak dalam biji dan mengubah komposisinya. Hamdi (2005) menyatakan bahwa kelembaban yang tinggi akan mendorong perkembangan jamur sehingga akan menurunkan produktivitas. tanaman jarak pagar tergolong tanaman hari panjang, yaitu tanaman yang memerlukan sinar matahari langsung dan terus menerus sepanjang hari. tanaman tidak boleh terlindung dari tanaman lainnya, yang berakibat akan menghambat pertumbuhannya. Seperti dinyatakan Mahmud (1998) dalam Saefudin *et al.* (2006)

bahwa tanaman jarak pagar toleran kekeringan akan tetapi tidak berarti bahwa tanaman ini dapat tumbuh dan berproduksi tinggi pada kondisi kekurangan air. Dalam perkembangannya, tanaman ini ditemui juga di lahan kering dataran rendah beriklim basah (LKDRIB) dan lahan kering dataran tinggi beriklim kering/basah (LKDTIK/LKDTIB) sebagai pagar pekarangan rumah atau kebun.

#### **4. Distribusi dan Potensi Pengembangan Jarak Pagar**

Tanaman jarak berasal dari Amerika Tengah. Sejauh ini tanaman jarak dikembangkan di wilayah Afrika Selatan, Ghana, Mali, Tanzania, Nikaragua, Mesir, Ethiopia, India, dan Amerika Selatan. Sedangkan di Indonesia tanaman ini dikembangkan untuk wilayah timur Indonesia seperti Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat, Gorontalo dan Sulawesi selatan. Wilayah-wilayah tersebut berkarakteristik curah hujan berkisar 300-1500 mm pertahun. Wilayah tersebut di atas sangat sesuai untuk tanaman jarak (Wijaya, 2006). Heller *et al.* (1996) dalam Wijaya (2006) melaporkan bahwa tanaman jarak berproduksi lebih rendah pada daerah dengan curah hujan tinggi dibandingkan dengan daerah kering. Curah hujan tinggi ini diduga tidak hanya menurunkan jumlah buah (biji) tetapi juga mengakibatkan rendahnya rendemen minyak jarak yang didapatkan. Padahal wilayah Indonesia didominasi oleh wilayah-wilayah dengan curah hujan tinggi (curah hujan di atas 2000 mm per tahun) relatif luas. Sebagian besar pulau-pulau besar di Indonesia memiliki curah hujan di atas 2000 mm per tahun. Oleh sebab itu perlu dilakukan kajian pustaka untuk merakit tanaman jarak pagar yang mempunyai produktifitas tinggi dan kadar minyak tinggi pada daerah dengan iklim tropik basah.

Menurut Hamdi (2006b) dan Mahmud (2006a) dalam Maman (2006), ada beberapa hal yang menjadi pertimbangan mengapa jarak pagar dipilih sebagai sumber bahan bakar nabati, yaitu :

9. Jarak pagar bisa hidup dan tetap produktif meski ditanam di lahan kritis dan tandus. Selain itu, jarak pagar sudah berproduksi sejak umur 4 - 5 bulan dan dapat dipanen terus menerus hingga umur 50 tahun.
10. Dapat meningkatkan pendapatan petani dan menghijaukan lahan kritis yang ada di Indonesia



seluas 10 juta ha dalam 3 tahun serta menyediakan lapangan pekerjaan baru.

11. Mampu menghemat devisa sebesar US\$ 17.2 milyar dari penggantian minyak solar, diesel, minyak tanah dan minyak bakar. Di samping itu, jarak pagar juga berpotensi menambah devisa negara bila produksinya melampaui kebutuhan dalam negeri.
12. Memacu kegiatan perekonomian yang mengikuti perkembangan usaha yang berhubungan dengan jarak pagar seperti perdagangan, jasa angkutan, penyimpanan, keuangan dan industri hilir.
13. Proses pengolahan minyak jarak kasar atau untuk kebutuhan rumah tangga sebagai pengganti minyak tanah dan untuk pembakaran tungku atau boiler sangat sederhana sehingga mudah diaplikasikan hingga ke pelosok pedesaan. Pengolahan jarak pagar untuk bahan bakar motor sebagai pengganti minyak solar juga tidak memerlukan teknologi tinggi sehingga biaya investasinya relatif lebih murah.

Beberapa kelebihan jarak pagar dalam Wijaya (2006) adalah : (1) Tanaman multi fungsi selain sebagai penghasil minyak tanaman ini juga berguna sebagai bahan baku obat-obatan dan juga dapat digunakan sebagai bahan pestisida alami. Biji tanaman jarak mengandung minyak sebesar 30 - 35 % (Joker and Jepsen, 2003), (2) Pertumbuhan tanam cepat dan berproduksi baik pada lahan-lahan marginal dengan input produksi yang minimal, produksi per tahun-tahun adalah 0,5 ton minyak per ha sampai dengan 12 ton per ha. Oleh sebab itu tanaman ini sesuai sebagai tanaman pioner dan sebagai tanaman konservasi (Kumar, 2005; International Programs Washington State university, 2002), dan (3). Karena beracun tanaman ini tidak disukai oleh hewan ternak dan hama, oleh sebab itu tanaman ini relatif tahan terhadap serangan hama dan penyakit (Kumar, 2005). Selain sifatnya terbarukan (*renewable fuels*), minyak jarak pagar bukan minyak makan sehingga tidak bersaing dengan kebutuhan konsumsi manusia, seperti halnya minyak kelapa sawit dan minyak jagung. Pembakarannya pun tidak menambah penumpukan gas karbondioksida di udara. karena gas yang dilepaskan berasal dari bahan organik hasil asimilasi CO<sub>2</sub> atmosfer (Borif, 2008).

Menurut Mulyani (2008) Keuntungan diversifikasi jarak pagar dengan tanaman pangan diantaranya adalah (1) persaingan lahan dan komoditas dapat dihindari, (2) petani tetap dapat berusaha tani komoditas utamanya, jarak pagar sebagai tanaman sela, (3) tidak perlu curahan tenaga kerja khusus untuk jarak pagar, (4) dapat keuntungan tambahan dari jarak.

Penanaman jarak pagar untuk memproduksi bahan baku minyak sebaiknya menggunakan bahan tanaman hasil pembibitan dari biji, karena tanamannya hidup lebih lama dan produksinya lebih tinggi daripada tanaman asal stek. Sedangkan untuk tanaman pagar dan pencegah erosi dapat digunakan bahan tanaman yang ditanam langsung baik berupa stek maupun biji (Mahmud *et al.*, 2006).

#### **v. Plasma Nutfah dan Pemuliaan Jarak Pagar**

Keberhasilan program pemuliaan untuk memperbaiki karakter suatu jenis tanaman budidaya sangat ditentukan oleh ketersediaan sumber genetik. Sumber genetik dapat berasal dari koleksi tanaman budidaya dan kerabat liar. Sumber genetik asal kerabat liar telah memberikan sumbangan berharga dalam program pemuliaan tanaman (Renwarin *et al.*, 1994).

Proses pemuliaan merupakan proses yang berkesinambungan dimana masalah yang dihadapi akan berbeda-beda pada setiap tahap dan setiap lokasi. Untuk itu perlu tersedianya plasma nutfah dengan keragaman genetik yang cukup luas dan dapat segera digunakan (Silitonga, 1996).

Variabilitas genetik suatu populasi plasma nutfah dapat diketahui dengan mengevaluasi berbagai karakter. Variabilitas genetik sangat mempengaruhi keberhasilan suatu proses seleksi dalam program pemuliaan. Perbaikan tanaman pada dasarnya tergantung dari tersedianya suatu populasi yang terdiri dari individu-individu yang memiliki susunan genetik berbeda dan memiliki adaptasi yang luas serta keefektifan seleksi terhadap populasi tersebut (Ruchjaningsih *et al.*, 2002).

Keragaman genetik plasma nutfah merupakan salah satu komponen dasar dalam sistem produksi pertanian, yang merupakan sumber dari sifat-sifat penting untuk perbaikan varietas. Untuk

mengetahui seberapa besar ragam genetik plasma nutfah yang dimiliki perlu dipelajari sifat-sifatnya terutama yang dapat membedakan satu dengan lainnya. Agar keragaman plasma nutfah dapat dimanfaatkan dalam program perbaikan varietas, maka potensi sifat-sifat yang dimiliki harus diketahui (Nugroho, 2007)

Menurut Arsyad *et al.* (1996), pemanfaatan plasma nutfah dianggap berhasil apabila dari plasma nutfah yang dimiliki dapat diidentifikasi sumber- sumber gen yang berguna dalam program pemuliaan dan selanjutnya dihasilkan varietas-varietas unggul baru.

Menurut Wijaya (2006) perlu dilakukan kajian pustaka untuk merakit tanaman jarak pagar yang memiliki produktivitas dan kadar minyak tinggi pada daerah dengan iklim tropik basah. Tujuan perakitan ini akan tercapai melalui beberapa langkah. Langkah awal adalah kegiatan koleksi dan identifikasi plasma nutfah jarak pagar baik yang berasal dari berbagai daerah agroekosistem di Indonesia maupun dari tanaman introduksi. Plasma nutfah ini diseleksi untuk mendapatkan kombinasi calon induk, selanjutnya dilakukan persilangan dan pada tahap akhir dilakukan evaluasi terhadap tanaman hibrida yang dihasilkan.

Pemanfaatan klon tanaman hibrida pada tanaman jarak menguntungkan karena produktivitas yang tinggi dan tanaman jarak mudah untuk diperbanyak secara vegetatif. Melalui perbanyakan vegetatif maka sifat unggul tanaman hasil persilangan tersebut dapat dipertahankan.

Seleksi adalah suatu kegiatan pemilihan tanaman baik secara individu maupun populasi berdasarkan karakter target yang diinginkan untuk diperbaiki. Tujuan dari seleksi adalah untuk memperbaiki proporsi karakter yang diinginkan pada populasi tanaman. Sehingga sifat-sifat yang tidak menguntungkan akan dibuang atau tidak dikembangkan lebih lanjut, sedangkan sifat yang dikehendaki akan dipertahankan dan dikembangkan pada generasi-generasi berikutnya. Pada akhirnya tanaman dengan karakter-karakter yang diinginkan itu berada pada populasi yang meluas, sementara sifat-sifat yang tidak dikehendaki menjadi punah (Widodo, 2003).

Sejalan dengan berkembangnya ilmu pengetahuan yang mampu mendukung percepatan

kemajuan dari seleksi untuk mendapatkan karakter yang diinginkan, maka berbagai metode seleksi juga berkembang sesuai dengan kemajuan ilmu pengetahuan. Salah satu metode seleksi yang dikembangkan sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan adalah seleksi tingkat molekuler.

## **6. Marka Molekuler**

Plasma nutfah unggul jarak pagar terbatas dan pemuliaan untuk mendapatkan klon unggul memerlukan waktu lama karena merupakan tanaman tahunan. Salah satu upaya mempercepat pemuliaan jarak pagar adalah memanfaatkan marka molekuler (Borif, 2008).

Marka molekuler yang pertama kali dikenal adalah marka protein yang secara genetik dikenal sebagai marka isozim (Hunter dan Markert, 1957 dalam Asrai, 2005). Isoenzim adalah enzim-enzim yang terdiri dari molekul-molekul aktif yang memiliki struktur kimia yang berbeda tetapi mengkatalis reaksi yang sama. Enzim tersebut diproduksi berdasarkan kode-kode yang dikontrol oleh gen yang terdapat pada lokus yang berbeda atau lokus yang sama. Isoenzim merupakan produk langsung dari gen dan relatif bebas dari pengaruh lingkungan, sehingga dapat digunakan sebagai ciri genetik untuk mempelajari dan mengidentifikasi keragaman individu atau suatu kultivar (Sukmajaya *et al.*, 1996). Meskipun marka ini telah banyak digunakan dalam analisis genetik tanaman, namun dalam perkembangannya, marka isozim masih sangat terbatas jumlahnya. Selain itu, beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, yaitu hanya mengekspresikan suatu sifat pada jaringan tertentu. Kedua faktor tersebut merupakan kendala utama penggunaan marka isozim dalam mengeksplorasi potensi genetik tanaman (Hamrick dan Gode, 1989). Menurut Asins *et al.* (1995) dalam Karsinah *et al.* (2002), penggunaan penanda isozim mempunyai keterbatasan yaitu umur tanaman berpengaruh terhadap pola pita yang dihasilkan. Disamping itu, penanda isozim menghasilkan polimorfisme yang terbatas, sehingga sulit untuk membedakan kultivar yang berkerabat dekat.

Kajian keragaman genetik tanaman sangat erat kaitannya dengan kajian tentang gen, DNA

dan kromosom. Seiring dengan perkembangan teknologi molekuler modern maka pengetahuan tentang DNA telah banyak dimanfaatkan dalam bidang biologi, kedokteran dan pemuliaan tanaman pertanian.

Dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan, maka pada awal tahun 1980-an ditemukan teknologi molekuler yang berbasis pada DNA, Marka molekuler tersebut dapat menutupi kekurangan dari marka isozim, karena dengan adanya penanda DNA yang langsung berintegrasi dengan sistem genetik lebih mencerminkan keadaan genom yang sesungguhnya. Penggunaan penanda DNA menawarkan alternatif analisis keragaman genetik (*DNA Fingerprinting*) yang lebih baik terutama mengkarakterisasi suatu populasi tanaman karena mampu menyediakan polimorfisme pita DNA dalam jumlah yang banyak, konsisten, dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Barahima, 2006).

Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman. Pemanfaatan marka DNA sebagai alat bantu seleksi *Marker Assisted Selection (MAS)* lebih menguntungkan dibandingkan dengan seleksi secara fenotipik. Seleksi dengan bantuan marka molekuler didasarkan pada sifat genetik tanaman saja, tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Dengan demikian, kegiatan pemuliaan tanaman menjadi lebih tepat, cepat, dan relatif lebih hemat biaya dan waktu (Azrai, 2005)

Seleksi berdasarkan karakter fenotipik tanaman di lapangan memiliki beberapa kelemahan seperti yang disarikan oleh Lamadji *et al.* (1999) dalam Azrai (2005), di antaranya (1) memerlukan waktu yang cukup lama, (2) kesulitan memilih dengan tepat gen-gen yang menjadi target seleksi untuk diekspresikan pada sifat-sifat morfologi atau agronomi, (3) rendahnya frekuensi individu yang diinginkan yang berada dalam populasi seleksi yang besar, dan (4) fenomena pautan gen antara sifat yang diinginkan dengan sifat tidak diinginkan sulit dipisahkan saat melakukan persilangan.

Pemilihan marka yang akan digunakan dalam analisis genetik perlu mempertimbangkan tujuan yang diinginkan, sumber dana yang dimiliki, fasilitas yang tersedia, serta kelebihan. dan kekurangan masing-masing tipe marka. Keberhasilan penggunaan suatu marka penyeleksi dalam

kegiatan pemuliaan bergantung pada tiga syarat utama yang harus dipenuhi (AMBIONET, 1998 dalam Azrai, 2006) yaitu: 1) tersedianya peta genetik dengan jumlah marka polimorfisme cukup memadai sehingga dapat mengidentifikasi QTL atau gen-gen mayor target secara akurat. 2) marka terkait erat dengan QTL atau gen mayor target pada peta genetik yang sudah dikonstruksi, dan 3) kemampuan menganalisis sejumlah besar tanaman secara efektif.

Jenis penanda molekuler yang dapat digunakan untuk mengungkapkan keragaman genetik tanaman sangat banyak, diantaranya STS, RAPD, SNPs, ekspresi gen, ISSR dan SSR.

## **7. Penanda Molekuler RAPD**

Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dalam analisis DNA tanaman, dengan menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Alat ini berguna mengamplifikasi DNA hasil ekstraksi dalam jumlah kecil dan waktu singkat. Penanda molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dihasilkan melalui proses amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dikembangkan oleh William *et al.* (1990).

Metode *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) merupakan pengembangan teknik PCR untuk mendeteksi keragaman genetik atau mengidentifikasi potongan DNA spesifik yang berkomplementer dengan DNA cetakan. RAPD bertujuan untuk menghasilkan banyak *copy* dari DNA cetakan. Potongan-potongan acak yang umumnya berukuran antara 250-2000 pasangan basa (*pb*) diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer tunggal, yang ada umumnya berukuran 10 pasangan basa. Reaksi RAPD umumnya menghasilkan 3-10 potongan DNA. Produk amplifikasi biasanya dianalisis dengan elektroforesis pada *gel* agarosa yang dilanjutkan pengecatan dengan etidium bromide.

Prinsip terjadinya reaksi amplifikasi melalui tiga tahapan yaitu (1) Denaturasi: dilakukan dengan pemanasan hingga 96°C selama 30-60 detik. Pada suhu ini DNA utas ganda akan memisah

menjadi utas tunggal. (2) Annealing: Setelah DNA menjadi utas tunggal, suhu diturunkan ke kisaran 40-60°C selama 20-40 detik untuk memberikan kesempatan bagi primer untuk menempel pada DNA template di tempat yang komplemen dengan sekuen primer. (3) Ekstensi/elongasi: Dilakukan dengan menaikkan suhu ke kisaran suhu kerja optimum enzim DNA polymerase, biasanya 70-72°C. Pada tahap ini DNA polymerase akan memasangkan dNTP yang sesuai pada pasangannya, jika basa pada template adalah A, maka akan dipasang dNTP, begitu seterusnya (pasangan A adalah T, dan C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lamanya waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi, secara kasarnya adalah 1 menit untuk setiap 1000 bp (Erich, 1989).

Selain ketiga proses tersebut biasanya PCR didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut: Pra-denaturasi: Dilakukan selama 1-9 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA Polymerase (jenis hot-start alias baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu). Dan Final Elongasi: Biasanya dilakukan pada suhu optimum enzim (70-72°C) selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir (Erich, 1989)

Penanda RAPD memiliki beberapa kelebihan, diantaranya tidak membutuhkan latar belakang pengetahuan tentang genom yang akan dianalisis, primer universal dapat digunakan untuk organisme prokariotik maupun eukariotik, mampu menghasilkan karakter yang relatif tidak terbatas jumlahnya, bahan-bahan yang digunakan relatif lebih murah, mudah dalam preparasi, dan memberikan hasil lebih cepat dibandingkan dengan analisis keragaman molekuler lainnya (Tingey *et al.* 1992; Weising *et al.* 1995). Kelebihan lain yang lebih spesifik adalah teknik RAPD lebih sederhana, yaitu : (1) DNA tidak perlu dipotong dengan enzim restriksi, (2) sampel DNA yang diperlukan relatif sedikit, (3) tidak memerlukan pemindahan DNA ke membran nilon, (4) tidak memerlukan hibridisasi DNA, dan (5) tidak memerlukan prosedur *labelling* (Barahma, 2006). Menurut Demeke dan Adams (1994) dalam Kasinah *et al.* (2002), prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat karena tidak memerlukan banyak tahapan,

membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5 - 5.0 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya. Teknik RAPD mempunyai keunggulan karena prosedurnya sederhana, mampu menyajikan hasil dalam waktu relatif singkat dan cepat karena setelah proses amplifikasi DNA hasil dapat segera divisualisasi dan akurat untuk tujuan identifikasi dan klasifikasi berbagai plasma nutfah (Griffin and Griffin, 1994).

Keuntungan teknik RAPD dibandingkan teknik lainnya seperti RFLP, AFLP dan mikrosatelit adalah prosedurnya cepat, hanya membutuhkan sedikit DNA cetakan, tidak memerlukan penyaringan hasil hibridisasi dan dapat digunakan *primer* umum atau bersifat acak (Halley *et al.* 1992). Walaupun metode ini kurang sempurna dan memiliki kelemahan dalam konsistensi produk amplifikasi, tetapi kelemahan ini dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi, dan kondisi PCR serta pemilihan *primer* yang tepat.

Kemampuan teknik RAPD untuk mendeteksi keragaman kultivar berbagai tanaman dalam waktu cepat merupakan peluang yang baik untuk memanfaatkan teknik tersebut dalam membantu mendata informasi genetik dan melihat variasi genetik secara cepat, sederhana dan efisien.

Analisis RAPD dapat digunakan untuk menetapkan dan melihat karakteristik variabilitas genetik diantara genotip tanaman dan dapat melihat kekerabatan pada tanaman tingkat tinggi. Hasil RAPD dapat mendeteksi tanaman melalui genotip lebih baik daripada hanya melihat fenotipnya. Selain itu, variabilitas genetik yang dihasilkan berbeda dari polimorfisme isozim atau protein, karena DNA merupakan komponen alel. Variabilitas yang diperlihatkan DNA pada alel lebih banyak daripada variabilitas berdasarkan biokimia dan morfologi (Watanabe, 1977).

Menurut Carvalho *et al.* (2004), analisis RAPD telah banyak digunakan karena metodenya cepat dan sederhana untuk menganalisis variabilitas genetik antar genotipe tanaman, populasi tanaman pada program pemuliaan dan koleksi plasma nutfah. Penanda RAPD telah berhasil digunakan untuk tujuan dalam bidang pemuliaan tanaman antara lain: 1) penyusunan peta genetik, 2) analisis struktur genetika populasi, 3) sidik jari individu, 4) pemetakan sifat-sifat, 5) penanda khas



pada bagian genom.

Metode RAPD mampu mendeteksi sekuen nukleotida dengan hanya menggunakan satu primer. Primer tersebut akurat berikatan dengan utas tunggal DNA genom yang satu dan pada utas DNA pasangannya dengan arah berlawanan. Selama situs penempelan primer masih berada dalam jarak yang masih dapat diamplifikasi, maka akan diperoleh produk DNA amplifikasi. Jarak tersebut pada umumnya tidak lebih dari 3000 bp atau 5000 bp. Semakin pendek fragmen yang akan diamplifikasi semakin efisien reaksi amplifikasinya (Tingey *et al.* 1992; Weising *et al.* 1995). Polimorfisme RAPD merupakan hasil dari perbedaan panjang DNA antara sekuen DNA yang berikatan dengan primer sehingga menyebabkan jumlah DNA yang teramplifikasi dan jarak migrasi pita DNA berbeda dan diikuti dengan tingginya variasi pola pita DNA (Poweli *et al.*, 1996 dalam Barahma, 2006).

Penggunaan teknik RAPD terus berkembang dan mencapai banyak kemajuan. Metode ini memungkinkan untuk identifikasi kekerabatan antar genotip secara tepat. Dimana kekerabatan mempengaruhi efek heterosis.

Penanda RAPD adalah penanda yang bersifat dominan yang berarti sifat tersebut tidak dapat dibedakan antara genotip heterosigot dengan sifat homosigot tetapi dapat dibedakan terhadap sifat resesif dengan cara mendeteksi ada dan tidaknya pita DNA (Rafalski *et al.*, 1994 dalam Nandariyah, 2007)

Beberapa penelitian yang memanfaatkan RAPD telah dilaporkan antara lain Karsinah *et al.* (2002) telah meneliti penggunaan RAPD untuk mendeteksi keragaman genetik plasma nutfah jeruk. Roslim *et al.* (2003) menggunakan penanda RAPD untuk mengetahui hubungan genetik populasi kelapa dalam Banyuwangi, Lubuk Pakam dan Paslaten. Lashermes *et al.* (2006) memanfaatkan teknik RAPD untuk analisis keanekaragaman genetik *Coffea arabica*. Julisaniah *et al.* (2008) menggunakan metode RAPD-PCR dan Isozim untuk menganalisis kekerabatan Mentimun (*Cucumis sativus* L.).

## 17. Kerangka Konseptual

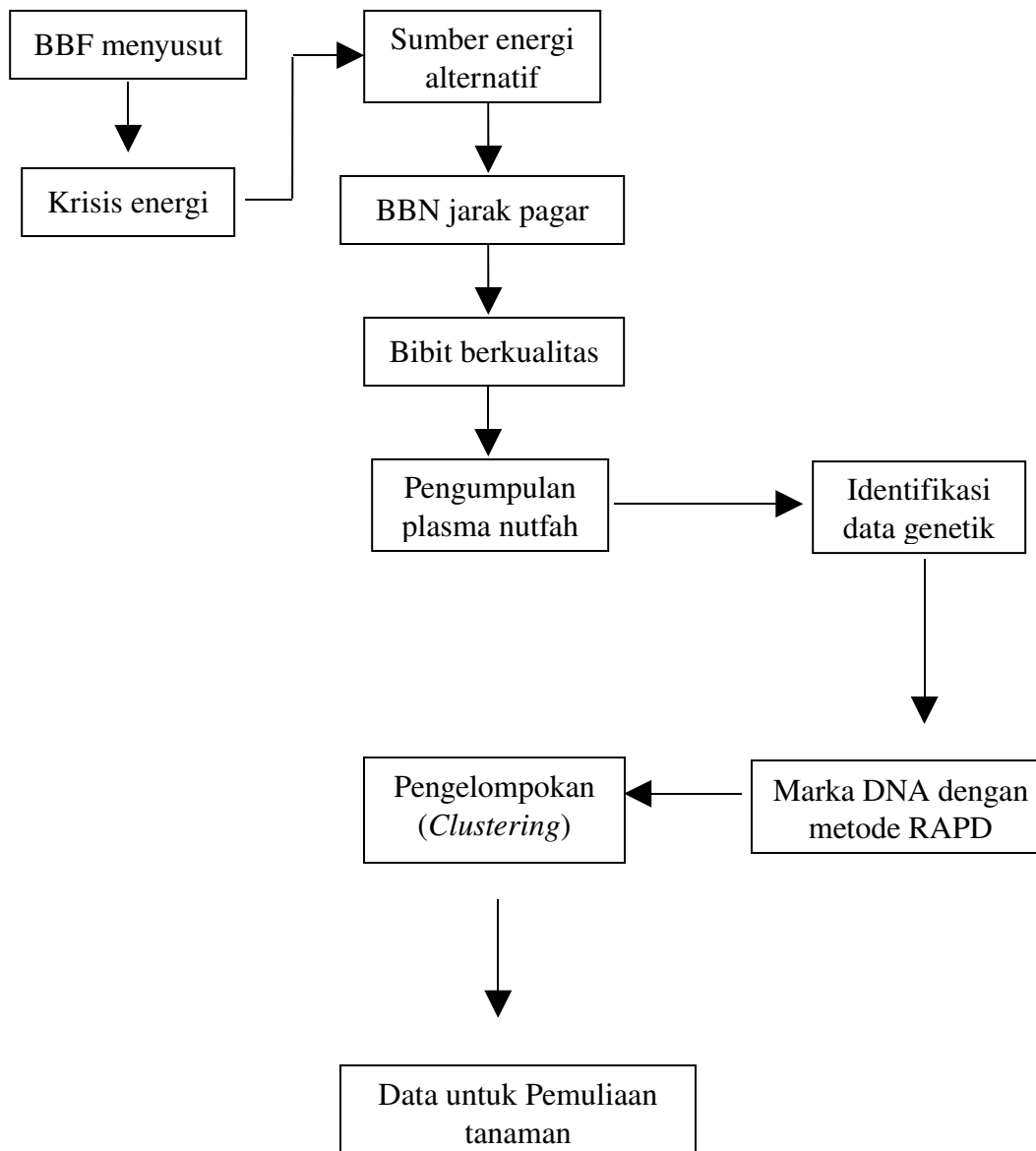
Ketergantungan akan BBF, yang sifatnya tidak dapat diperbarui (*unrenewable*) menyebabkan krisis energi akibat menyusutnya cadangan BBF dunia. Energi alternatif yang dapat diperbarui dari BBN merupakan suatu solusi yang menjanjikan dalam mengatasi krisis energi yang berkepanjangan. Salah satu sumber BBN yang prospektif adalah minyak jarak pagar (*Jatropha curcas*) yang dapat menggantikan minyak diesel. Namun, penyediaannya terkendala pada ketiadaan sumber klon-klon unggul yang dapat bereproduksi tinggi. Beberapa permasalahan yang dihadapi saat ini yaitu belum adanya informasi tentang varietas unggul dan metode yang efektif dalam memperbanyak tanaman jarak pagar.

Pemuliaan tanaman menemui hambatan karena kurangnya informasi genetika yang memadai sebagai sumber acuan dalam proses pemuliaan. Upaya perakitan varietas unggul dapat dilakukan melalui kegiatan pemuliaan tanaman dan salah satu faktor penentu keberhasilan program perakitan varietas unggul adalah tersedianya keragaman genetik. Keragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat dipantau dengan mata telanjang, atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu.

Usaha untuk meningkatkan keragaman genetik dapat dilakukan melalui teknik poliploidisasi, mutasi, ataupun teknik-teknik yang lain dan untuk mendukung kegiatan pemuliaan tersebut diperlukan pengkajian terhadap keragaman genetik. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengkaji keragaman genetik, salah satunya adalah analisis keragaman genetik secara molekuler dengan metode RAPD.

Perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang molekuler, khususnya pada pengkajian karakter genetik telah menghasilkan kemajuan yang sangat pesat. Salah satu contohnya adalah metode RAPD. RAPD merupakan salah satu metode yang dapat diterapkan untuk menggali informasi genetika mengenai keragaman, klasifikasi, dan selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar dalam

pemuliaan tanaman yang dikorelasikan dengan sumber data-data yang lain seperti morfologi dan data sitologi. RAPD juga dapat meningkatkan efisiensi dan efektifitas pada proses seleksi dari hasil persilangan yaitu memperpendek waktu seleksi karena tidak perlu menunggu sampai tanaman berproduksi dan dapat dilakukan pada semua jaringan tanaman. Secara konseptual kerangka pemikiran dari penelitian ini dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Skema Kerangka Konseptual Penelitian

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Kajian Buah Tropika IPB, Bogor mulai bulan Pebruari 2009 sampai Mei 2009.

#### **B. Bahan dan Alat**

##### **1. Bahan Penelitian**

- 1). Bahan tanaman jarak pagar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 22 aksesori tanaman jarak pagar yang berasal dari wilayah Jawa Timur, NTT, NTB, Jawa Tengah, Jawa Barat, Palembang (Sumatra), Sumatra Barat, Bengkulu (Sumatra) dan Sulawesi Selatan koleksi KIJP Asembagus dan dari koleksi pertanian UNS.
- 2). Buffer Ekstraksi (BE)
- 3). Polivinilpolipirilidon (PVPP)
- 4). Merkaptotanol
- 5). Nitrogen cair, pasir kuarsa
- 6). Larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v),
- 7). Isopropanol,
- 8) alkohol 70% dan alkohol 95%,
- 9). Buffer TE (Tris-HCl - EDTA)
- 10). Na-asetat 3M,
- 11). Agarosa,

- 12). Etidium bromide,
- 13). Larutan Tris-asetat EDTA (TAE) 1X
- 14). Master mix ( Promega).
- 15). *Primer* RAPD yang dipilih ada 4 primer yaitu :
  - a. OPG - 2
  - b. OPE - 7
  - c. SBH - 3
  - d. SBH - 15

## **2. Alat yang Digunakan dalam Penelitian**

- 1). Tabung Ependorf
- 2). Mikropipet
- 3). Alat elektroforesis
- 4). UV transluminator
- 5). Timbangan Digital
- 6). Mesin PCR
- 7). Erlenmeyer
- 8). incubator/water bath
- 9). Sentrifuse
- 10). pH meter
- 11). Kamera digital
- 12). Mortar
- 13). Microwave
- 14). Spatula

## **C. Rancangan Penelitian**

Data keragaman hasil elektroforesis pada RAPD berdasarkan penampilan pola pita DNA dianalisis menggunakan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.02i (NTSYS) metode *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering* (SAHN). Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendogram.

## **D. Prosedur Pengambilan Data**

#### 14. Isolasi DNA

DNA disolasi dari bagian daun yang masih muda (bagian pucuk) menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Sebanyak 0,75 g daun muda jarak pagar dari masing-masing sampel dihaluskan dalam cawan porselin dengan menambahkan pasir kuarsa agar mudah digerus. Untuk mencegah pencokelatan jaringan akibat oksidasi, ke dalam cawan berisi sampel ditambahkan polivinilpolipirilidon (PVPP) sebanyak  $\pm 40$  mg, kemudian ditambahkan larutan buffer ekstrak (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, aquades dan mercaptoetanol 1%) sebanyak 1 kali volume sampel.

Sampel yang sudah ditambah dengan buffer ekstrak, diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit, kemudian ditambahkan CIAA (chloroform isoamilalkohol 24:1) hingga mencapai 1 kali volume. Sampel yang sudah ditambahkan CIAA kemudian di vortek selama 3-5 menit dengan tujuan supaya CIAA tercampur homogen dengan sample yang telah diinkubasi. Supernatan dipisahkan dengan sentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm (rotate per minute) selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet dengan jalan memipetnya ke dalam tabung ependorf yang baru.

DNA dalam supernatan dimurnikan dengan menambahkan 1 ml larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v) dan divortek selama 3-5 menit kemudian disentrifuse pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung dan ditambah 1 kali volume isopropanol dingin, dikocok perlahan sampai timbul benang-benang putih yang merupakan DNA. Selanjutnya DNA diendapkan dengan jalan larutan diinkubasi selama satu malam (over night) di dalam lemari es. Larutan berisi DNA yang sudah dimurnikan disentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit dan selanjutnya isopropanol dibuang, hingga terlihat endapan DNA berupa pelet pada ujung ependorf. Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol/EtOH 70%, kemudian disentrifuge kembali dengan menggunakan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Alkohol dibuang dan pelet DNA dikeringkan pada suhu ruangan dengan posisi terbalik selama 1-2 jam.

Pelet DNA yang sudah kering dilarutkan dalam 100  $\mu$  l bufer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5;

10mM EDTA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam dan siap menjadi stok DNA untuk di tes kuantitas DNA (tes agarose) dengan tujuan untuk mengetahui DNA total.

## **2. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA**

Uji kualitas DNA dilakukan dengan proses elektroforesis dilakukan dengan tes agarosa untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi. Pembuatan gel agarosa 0,8 % dengan jalan melarutkan 0,32 g agarosa dalam 40 ml larutan Tris-asetat EDTA (TAE) IX dan dipanaskan dalam *microwave* selama dua menit. Larutan agarose yang sudah hangat (suam-suam kuku), dituang dalam cetakan elektroforesis yang telah disiapkan dan dibiarkan lebih kurang satu jam sampai agarose padat. Kemudian gel diletakkan ke dalam bak elektroforesis yang telah berisi larutan TAE IX sampai gel terendam. Sampel DNA yang akan diuji diambil sebanyak 5µl dan ditambahkan loading buffer sebanyak 2µl, selanjutnya sampel yang telah disiapkan dimasukkan dalam sumur gel dan dielektroforesis selama lebih kurang satu jam pada voltase 110V. Hasil elektroforesis tersebut diwarnai dengan melakukan perendaman pada larutan Ethidium Bromide (EtBR 1%). Penetapan konsentrasi dan kualitas DNA, hasil elektroforesis diamati di bawah UV transiluminator. Kualitas dan kuantitas DNA yang ditunjukkan dari hasil elektroforesis DNA berupa garis putih tebal yang tampak di atas lampu UV transiluminator.

## **3. Purifikasi DNA**

DNA stok dipurifikasi dengan menambahkan 400 µl TE dan 500 µl larutan phenol : kloroform : isoamilalkohol (1:24:1 = v/v) dingin, kemudian dicampur dan disentrifuse pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan dimurnikan kembali dengan menambahkan 1 ml larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1 = v/v) dan disentrifuse pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Lapisan atas supernatan dipindah ke tabung baru kemudian ditambah dengan 1 ml isopropanol dingin, dikocok perlahan sampai timbul

benang-benang putih yang merupakan DNA dan diinkubasi dalam freezer selama semalam.

Larutan berisi DNA yang sudah diinkubasi dalam freezer selama semalam dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit kemudian disentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan selanjutnya supernatan dibuang. Endapan yang merupakan DNA dicuci dengan alkohol 70% serta dikeringkan pada suhu ruangan selama kurang lebih satu jam.

Selanjutnya endapan DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 100  $\mu$  l bufer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 10mM EDTA) dan disimpan dalam freezer sebagai stok DNA. Uji kualitas DNA hasil purifikasi dilakukan dengan teknik elektroforesis pada agarosa 0.8 %.

#### 4. Pemilihan *Primer* untuk Analisis RAPD

Untuk mendapatkan primer RAPD yang dapat mengamplifikasi DNA, dilakukan seleksi *primer* dengan *DNA Bulk* (Campuran) yang dapat menghasilkan pita polimorfik pada aksesori-aksesori yang diuji, maka dilakukan seleksi terhadap beberapa *primer*. *Primer* yang diseleksi adalah *Primer* OPE7, OPE 11, OPG 2, OPG 11, SBR 4, SBR 8, SBH 2, dan SBN 1.

Urutan basa pada *primer* yang digunakan adalah :

OPE 7 : AGATGCAGCC

OPE 11 : GAGTCTCAGG

OPG 2 : GGCACTGAGG

OPG 11 : CAGTTTCGAGG

SBR 4 : AATCGGGCTG

SBR 8 : GTGACGTAGG

SBH 2 : TCGGACGTGA

SBN 1 : GAATGTACTG

Pemilihan *primer* didasarkan pada hasil optimasi *primer* yang telah dilakukan sebelumnya.

Komposisi PCR adalah 1  $\mu$ l larutan DNA stok yang telah diencerkan 10 kali, 0.5  $\mu$ l primer, 6  $\mu$ l *Go Taq*



*Green Master Mix* (Promega), dan air bebas ion sebanyak 5 µl, sehingga volume akhir reaksi PCR adalah 12.5 µl.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler sebanyak 35 siklus setelah pra PCR selama 4 menit pada 94° C, dengan tiap siklusnya terdiri dari denaturasi selama 30 detik pada 94° C, 30 detik pada 36° C untuk penempelan *primer*, dan 1 menit pada 72°C untuk pemanjangan fragmen DNA dan selanjutnya ekstensi pada 72°C selama 5 menit.

## **6. Analisis Polimorfisme DNA dengan RAPD**

Tingkat polimorfisme yang tinggi dari sampel yang diamati, dilakukan seleksi terhadap *primer* acak RAPD. Penetapan primer hasil seleksi untuk pengujian tingkat polimorfisme jarak pagar adalah berdasarkan jumlah pita DNA contoh yang dihasilkan tegas dan terbanyak. Amplifikasi DNA contoh dilakukan dengan mesin PCR Applied Biosystems Thermal Cycler Version 2.00. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 45 siklus yang terdiri atas satu menit pada suhu 94°C (denaturasi), satu menit suhu 55°C (annealing), dan dua menit suhu 72°C (ekstension). Komposisi PCR terdiri dari 3 µl DNA template (hasil pengenceran 10x dari stok DNA), go taq master mix (Promega) sebanyak 6 µl, *primer* 0,5 µl dan air bebas ion sebanyak 3 µl. Total volume untuk PCR sebanyak 12,5µl.

Hasil amplifikasi DNA contoh difraksinasi dengan elektroforesis 1,2% gel agarose (0,48 gram agarose dilarutkan dalam 40 ml TAE 1x). Elektroforesis menggunakan bufer TAE 1x pada kondisi voltase tetap 110 volt selama lebih kurang satu jam. Pewarnaan hasil elektroforesis dilakukan dengan merendam agarose dalam larutan Ethidium Bromide (EtBR 1%) kemudian dilihat di atas lampu UV transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital

Resolusi setiap pita DNA contoh hasil amplifikasi tidak selalu terlihat jelas, tergantung pada jumlah fragmen yang dapat teramplifikasi pada genom tanaman. Makin banyak fragmen DNA contoh teramplifikasi, resolusi pita DNA makin jelas. Weising *et al.* (1995) menyatakan bahwa lebih kurang

90% DNA genom merupakan urutan yang berulang.

## 6. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan merendam gel agarose dalam larutan TAE 1x sampai gel terendam. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 110 volt selama 1 jam. Pewarnaan gel hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan larutan Ethidium Bromide (EtBR) yang telah dilarutkan dengan konsentrasi 1%. Gel yang telah diwarnai direndam kembali dalam air aquades steril selama 1 menit dan dilanjutkan dengan dokumentasi di atas uv transiluminator dan didokumentasikan menggunakan foto digital merk Canon PC1267 7.1 mega pixels.

## E. Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dari hasil elektroforesis pada RAPD berdasarkan penampilan pola pita DNA menggunakan analisis gerombol (*cluster analysis*) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.02i (NTSYS) metode *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering* (SAHN) (Rohlf, 1993). Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendogram. Ukuran derajat jarak kemiripan genetik tanaman jarak pagar yang diamati berdasarkan koefisien kemiripan (*similarity coefficient*) atau jarak genetik (*genetic distance*) dengan menggunakan metode *Group Average Clustering* yang ada dalam program NTSYS dipilih metode *Unweight PairGroup Method Arithmetic* (UPGMA) dengan rumus sebagai berikut :

$$d_{(ij)k} = \frac{\sum_{i \in (ij)} \sum_{k \in k} d_{st}}{n_{(ij)} + n_k}$$

Keterangan :

$d_{(ij)k}$  = ukuran ketidakmiripan antara gerombol ke-k dengan gerombol ij yang

merupakan penggabungan ke-i dan ke-j

$d_{st}$  = ukuran ketidakmiripan antara gerombol ke-s dalam gerombol ij dan gerombol ke-t dalam gerombol k

$n_{(ij)}$  = jumlah anggota i dalam gerombol ij

$n_k$  = jumlah anggota gerombol k

Fragmen yang dihasilkan pada analisis RAPD yang tampak sebagai pita-pita DNA diterjemahkan menjadi data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita yang dimiliki secara bersama oleh individu tanaman yang dianalisis. Pita DNA memiliki ukuran pasangan basa (bp) tertentu. Setiap pita dianggap sebagai satu lokus sehingga pita yang sama dari contoh tanaman diinterpretasikan sebagai satu lokus yang homolog. Lokus tersebut diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai satu (1) untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita.

Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang dimiliki bersama. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi *Similarity Qualitative* (SIMQUAL) pada program NTSYS versi 2.02 (Rohlf, 1993). Data matriks kemiripan genetik dihitung dengan rumus dari koefisien Dice (S) (Nei, 1987) yaitu :

$$S = 2n_{ab}/(n_a+n_b)$$

Keterangan:

S = Koefisien kemiripan;

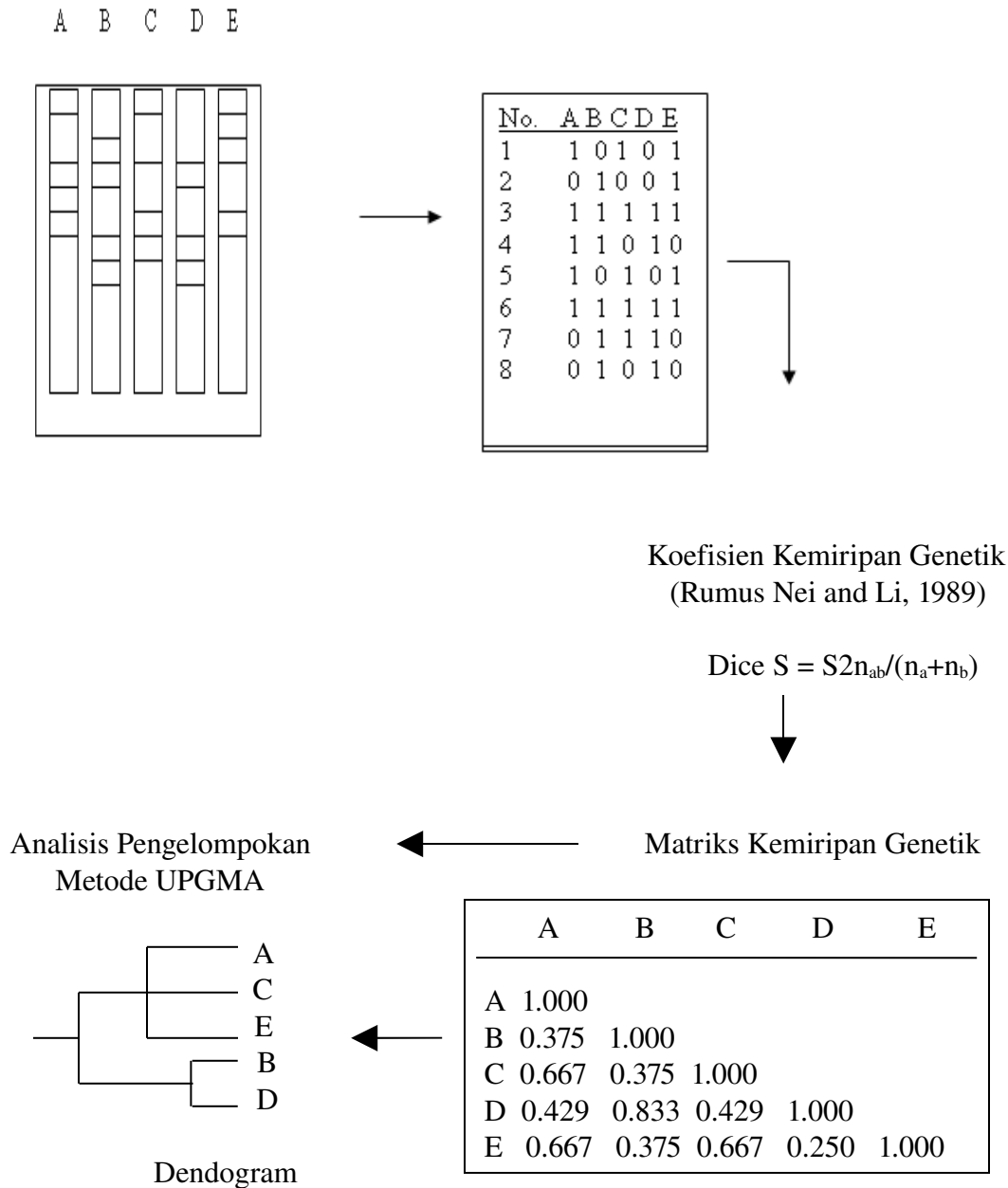
a dan b = individu tanaman;

$n_{ab}$  = jumlah pita yang posisinya sama

$n_a$  = jumlah pita individu tanaman a

$n_b$  = jumlah pita individu tanaman b

Secara skematik, alur analisis data dari pita DNA yang dihasilkan dalam penelitian mulai transformasi pita ke dalam data biner sampai penampilan data dalam bentuk pengelompokan dendogram menggunakan metode UPGMA.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan nilai 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan (Lampiran 1). Pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan dendogram dilakukan dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) versi 2.02i.

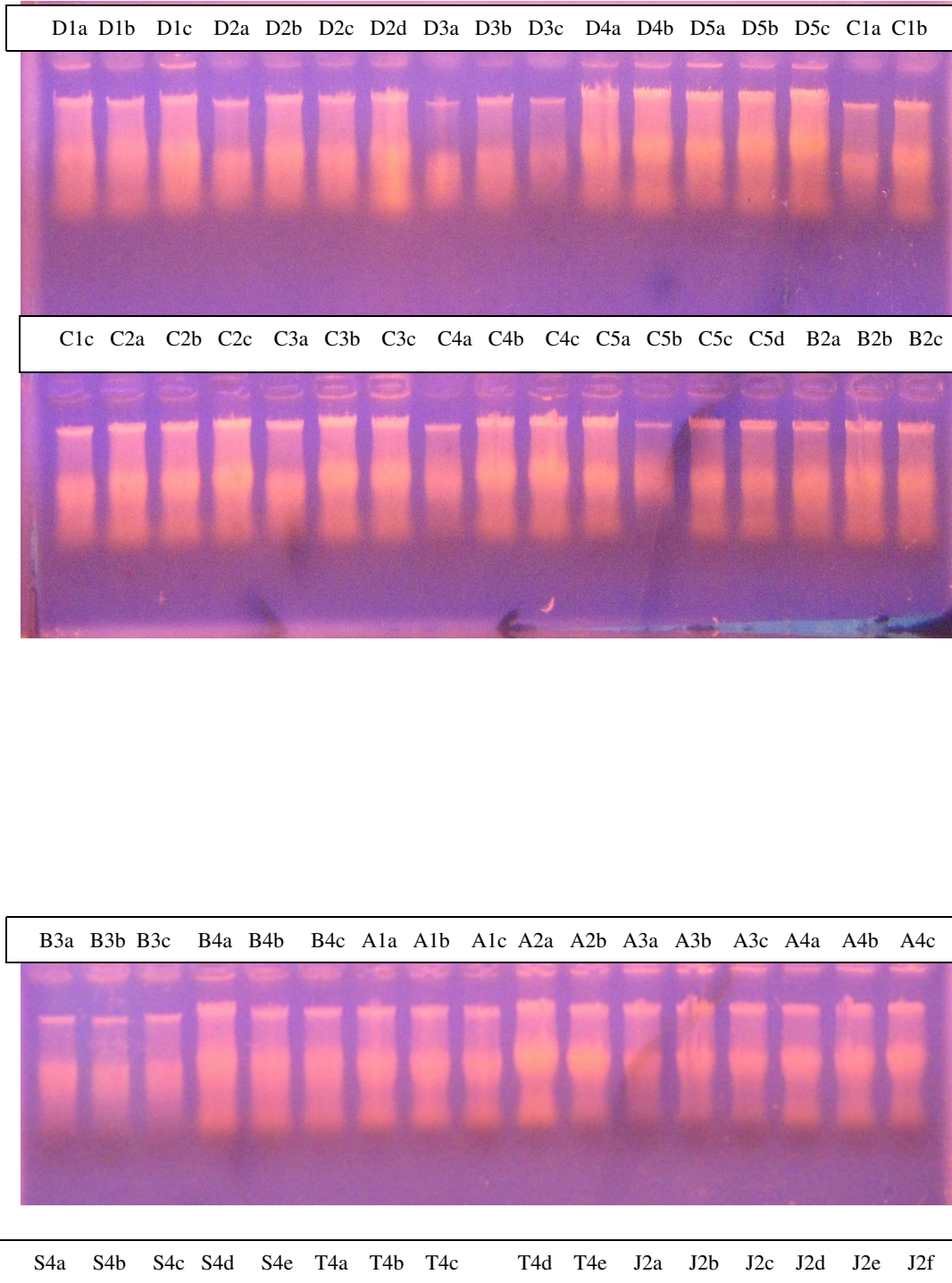
Data yang diperoleh dari pemotretan gel hasil RAPD berupa pita-pita diskrit dengan ukuran tertentu dari masing-masing aksesori jarak pagar. Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Nomor pita diurutkan dari jarak pita terdekat dengan batas bawah sumur. Pengukuran potongan DNA genom dilakukan dengan membandingkannya dengan berat molekul standar 1 Kb DNA Ladder. Perbedaan antar nomor aksesori jarak pagar ditunjukkan oleh jumlah pita dan jarak migrasinya.

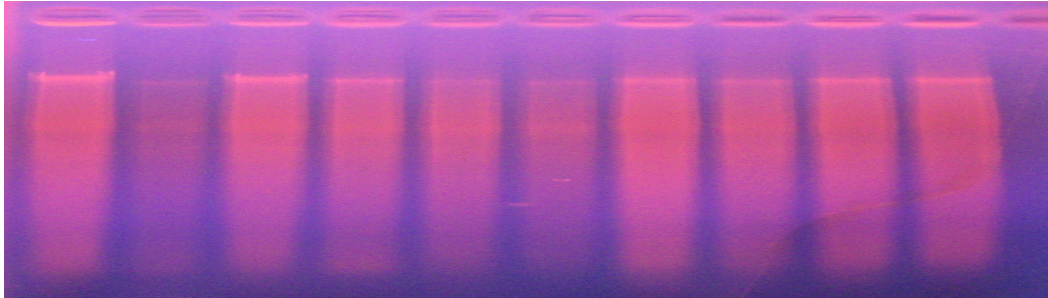
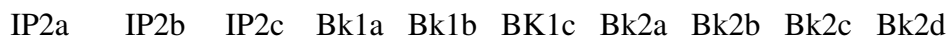
Sebelum dilakukan analisis RAPD, maka ada beberapa pertimbangan yang harus dilakukan sehingga akan diperoleh hasil analisis yang memuaskan. Dengan kata lain, optimasi beberapa parameter perlu dilakukan. Karena telah ada beberapa peneliti yang melakukan penelitian dengan metode yang serupa, maka metode optimasi yang telah digunakan oleh peneliti dapat diaplikasikan pada penelitian ini. Dari hasil optimasi tersebut ternyata parameter dan kondisi PCR yang digunakan dapat diaplikasikan pada kegiatan ini.

Penelitian untuk menghasilkan kelompok-kelompok jarak pagar berdasarkan penanda RAPD dilakukan secara bertahap meliputi: a) Ekstraksi DNA, b) purifikasi DNA, c) seleksi *primer* yang digunakan untuk menghasilkan penanda RAPD yang polimorfik, d) penggandaan DNA dengan teknologi PCR, e) penyusunan matriks similaritas dan f) penyusunan dendogram.

## A. Hasil Ekstraksi / Isolasi DNA

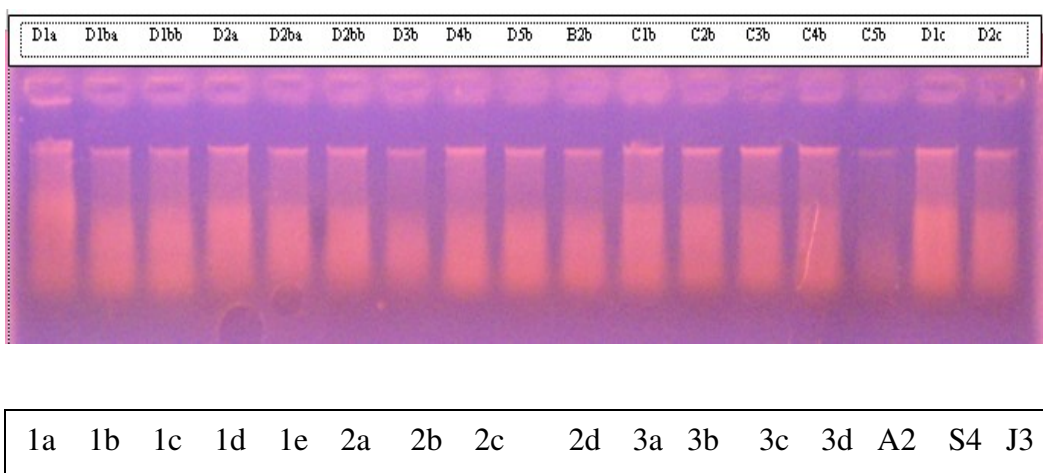
Kualitas dan kuantitas DNA yang ditunjukkan dari hasil elektroforesis DNA berupa garis putih tebal yang tampak di atas lampu UV transiluminator. Hasil isolasi DNA ditampilkan pada gambar berikut :



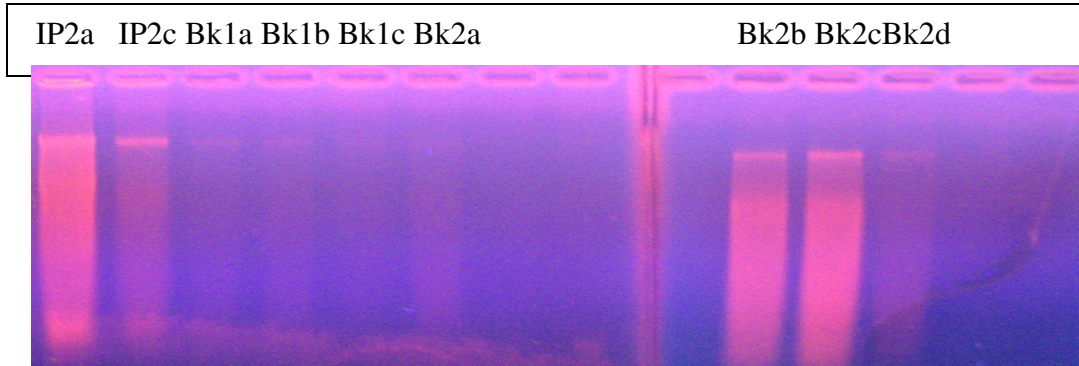
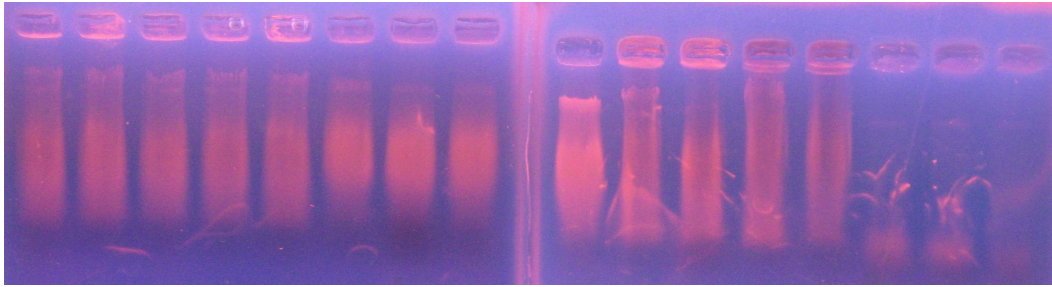


Hasil uji kualitas DNA menunjukkan bahwa DNA yang dihasilkan masih mengandung pengotor-pengotor lain selain DNA sehingga masih belum dapat dilanjutkan ke tahapan selanjutnya, yaitu amplifikasi dengan PCR, sehingga dibutuhkan tahap purifikasi DNA untuk mendapatkan DNA yang bersih dan siap untuk diamplifikasi pada proses PCR.

Uji kualitas DNA hasil purifikasi dilakukan dengan teknik elektroforesis pada agarosa 0.8 %. Berikut merupakan hasil DNA sesudah purifikasi.





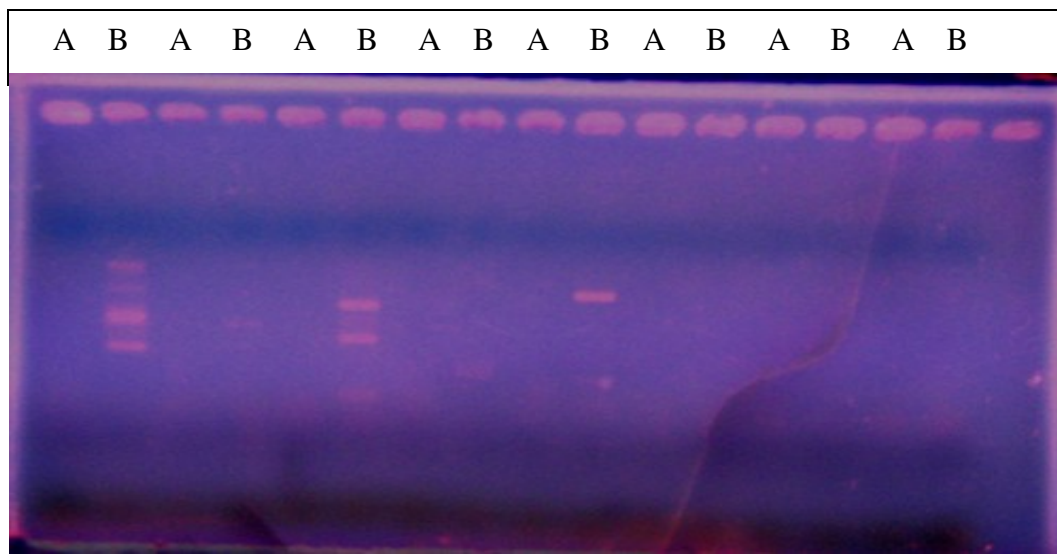


Gambar 6. Hasil Purifikasi DNA

DNA hasil purifikasi terlihat lebih bersih dibandingkan sebelumnya dan siap untuk diamplifikasi pada proses PCR.

### C. Hasil Seleksi *Primer*

Berikut adalah hasil seleksi *primer* yang telah dilakukan.





OPE7	OPE 11	OPG 2	OPG 11	SBR 4	SBR 8	SBH 2	SBN 1
------	--------	-------	--------	-------	-------	-------	-------